

UNIVERSITÉ DE CLERMONT
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1965

N° 4

THÈSE

POUR LE
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Jacqueline PETIT-BOULOGNE

Pharmacien

*Assistant à la Faculté mixte de Médecine
et de Pharmacie de Clermont*

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT EN DÉCEMBRE 1965

**Utilisation des résines échangeuses d'ions
et de couches multiples juxtaposées
en chromatographie sur couches minces**

Président : M. DAUPHIN, Professeur.

Membres du Jury : { M. MEYNIEL, Doyen
M. BERGER, Professeur
M^{me} CHATONNIER, Maître de conférences
Agrégee

G. DE BUSSAC
CLERMONT-FERRAND
1965

UNIVERSITÉ DE CLERMONT
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1965

N°

THÈSE

POUR LE
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Jacqueline PETIT-BOULOGNE

Pharmacien

*Assistant à la Faculté mixte de Médecine
et de Pharmacie de Clermont*

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT EN DÉCEMBRE 1965

**Utilisation des résines échangeuses d'ions
et de couches multiples juxtaposées
en chromatographie sur couches minces**

Président : M. DAUPHIN, Professeur.

Membres du Jury : { M. MEYNIEL, Doyen
M. BERGER, Professeur
M^{lle} CHATONNIER, Maître de conférences
Agrégée

G. DE BUSSAC
CLERMONT-FERRAND

1965



UNIVERSITE DE CLERMONT

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Doyen : G. MEYNIEL

Directeur Honoraire : M. MERLE

Assesseur : M. COULET

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET, MM. BUREAU, FOURNIER, GAUTHIER, LIMOUSIN, POMMÉ

I. — *Professeurs titulaires*

MM. BARRIER	Clinique chirurgicale A.
BAUDON	Clinique obstétricale.
BERGERON	Pathologie médicale.
BERNARD-GRIFFITHS	Clinique médicale A.
COULET	Botanique et microbiologie.
CUVELIER	Hydrologie et climatologie.
DASTUGUE	Biochimie médicale.
DAUPHIN	Chimie pharmaceutique et toxicologie.
FEBVRE	Pharmacie galénique.
GRAS	Thérapeutique.
JACQUEMET	Technique chirurgicale.
LATAIX	Pathologie chirurgicale.
MEYNIEL	Biophysique médicale.
MOLINA	Clinique pneumo-phtisiologique.
PETIT	Médecine légale et médecine sociale.
POROT	Neurologie et psychiatrie.
POURRAT	Matière médicale.
ROUHER	Clinique ophtalmologique.
TERRASSE	Clinique médicale B.
THIEBLot	Physiologie.
TRONCHE	Pharmacie chimique.
TURCHINI	Histologie et embryologie.
VAURS	Bactériologie et hygiène.
WILLEMIN-CLOG	Clinique médicale infantile.

II. — *Professeurs à titre personnel*

MM. THOMAS	Oto-Rhino-Laryngologie
VIALLET	Electro-Radiologie

III. — *Professeurs sans chaire*

MM. BASTIDE	Sciences naturelles.
BERGER	Chimie analytique
DUCHÊNE-MARULLAZ	Physiologie.
GERMAIN	Clinique chirurgicale B.

IV. — *Maîtres de Conférences agrégés*

MM. ALFIERI	Biophysique médicale.
BOSSY	Anatomie.
Mlle CHATONIER	Chimie minérale et minéralogie.
MM. CLUZEL	Bactériologie.
N.....	Biochimie médicale.
DELAGE	Anatomie pathologique.
Mmes GAILLARD	Physique pharmaceutique.
MOINADE	Médecine générale et thérapeutique.
M. PIGNIDE	Médecine générale.
V. DE LAGUILLAUMIE	Anatomie pathologique

V. — *Agrégés*

MM. CHAMPEIX	Médecine légale et Médecine du travail.
FOURIER	Orthopédie.
HOUDARD	Chirurgie générale.
JALLUT	Médecine générale.
JANNY	Neuro-chirurgie.
MENUT	Pédiatrie et puériculture.
MERCIER	Chirurgie générale.
Mlle RAMPON	Médecine générale.
MM. RENARD	Pneumo-phtisiologie.
TOURNILHAC	Neurologie et psychiatrie.

Attaché principal : M. BERTHON

Bibliothécaire universitaire : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner, ni approbation ni improbation. (Délibération en date du 6 juin 1956).

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MON MARI ET A MA FILLE

A MES BEAUX-PARENTS

A MA TANTE

A MA FAMILLE

avec toute mon affection.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

*C*E travail a pu être réalisé grâce à une étroite collaboration technique entre les laboratoires de Chimie Pharmaceutique et de Biophysique.

Depuis qu'elle nous a accueillie dans son service, il y a déjà quelques années, Mme le Professeur BLANQUET n'a jamais cessé de s'intéresser à notre avenir et de nous prodiguer, avec sa gentillesse coutumière, ses encouragements affectueux. Qu'elle nous permette de lui dédier cette thèse, modeste témoignage de notre filial dévouement.

M. le Professeur DAUPHIN nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous avons été très sensible à la bienveillance qu'il nous a témoignée depuis notre entrée dans son laboratoire. Travaillant à ses côtés, nous avons pu apprécier l'amabilité souriante, avec laquelle il dirige une équipe étroitement unie. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous tenons tout spécialement à remercier M. le Doyen MEYNIEL qui nous a toujours réservé l'accueil le plus chaleureux. Dès son arrivée à Clermont-Ferrand, il nous a accordé toute sa confiance et a toujours porté un vif intérêt à notre carrière. Non seulement il a mis à

notre disposition les moyens nécessaires à l'élaboration de cette thèse, mais il nous a également fait bénéficier de son expérience et de sa grande érudition. Nous sommes heureuse aujourd'hui de le voir siéger parmi nos juges ; qu'il trouve ici l'expression de notre fidèle et respectueux attachement.

Nos remerciements vont avant tout à M. le Professeur BERGER, qui a inspiré le sujet de ce travail. Il a collaboré activement à son élaboration et nous a permis de le mener à bien, grâce à la rigueur de son esprit scientifique et à l'étendue de ses connaissances. Nous tenons à lui exprimer notre gratitude et le prions d'accepter nos sentiments de profonde et durable amitié.

Nous sommes également reconnaissante à Mlle CHATONIER, Maître de conférences agrégée, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à cette thèse et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'être notre juge. Qu'elle trouve ici le gage d'une vive amitié, fruit de nombreuses années de travail en commun.

Nous associons dans une même pensée tous nos amis des laboratoires de Chimie Pharmaceutique et de Biophysique qui furent nos voisins de chaque jour dans la recherche.

Nous tenons à exprimer notre respectueuse reconnaissance à tous nos maîtres de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand.

INTRODUCTION

A l'époque du grand succès de la Chromatographie sur colonne de Tswett, voilà plus d'un quart de siècle, Zeichmeister (152) écrivait : « *Le problème majeur de la micro-chromatographie ne tient pas au montage de l'appareillage, mais bien au contraire à l'identification irrécusable des substances adsorbées* ». Les progrès réalisés depuis dans la sensibilité et la spécificité des techniques physiques de détection ont contribué puissamment au succès de la chromatographie sur couches minces, appelée en 1938, au moment de son apparition, « *chromatographie sur colonne ouverte* ».

Ismaïlov et Schraiber (57), qui les premiers décriront les principes de cette nouvelle méthode, utilisaient des couches de 2 mm. d'alumine, de chaux ou de magnésie anhydres, étalées sur des lames porte-objets de microscope, pour séparer, entre autres, des extraits de plantes pharmaceutiques, et des mélanges d'huiles essentielles.

Crowe (23) en 1941 obtint de bons résultats en opérant sur des couches pulvérulentes déposées dans des capsules de Pétri. Pourtant la technique sombra rapidement dans l'oubli et il fallut attendre près d'une dizaine d'années, pour que Williams (148) décrivit en 1947 une technique améliorée. Sa méthode consistait à emprisonner littéralement la couche de poudre adsorbante entre deux plaques de verre, la plaque supérieure percée d'un trou central permettant l'arrivée de la solution à analyser et du solvant.

L'étape suivante fut réalisée par Meinhart et Hall (78) en 1949, qui reprirent le procédé de Williams, en ajoutant à la poudre

adsorbante un liant à base d'amidon, lui conférant ainsi une stabilité mécanique, qui lui faisait défaut jusqu'alors.

Entre temps, d'autres techniques chromatographiques avaient pris un essor spectaculaire et tout spécialement la chromatographie sur papier filtre, mise au point en 1944 par Consden, Gordon et Martin (22). Les résultats remarquables, obtenus par ces auteurs dans la séparation des acides aminés, leur valurent d'ailleurs le prix Nobel et provoquèrent un véritable engouement pour cette technique de la part des chercheurs et des analystes. Un nombre considérable de travaux lui ont été consacrés depuis et elle demeure encore, à l'heure actuelle, une méthode extrêmement précieuse. Pourtant, on s'aperçut très vite que son extension se trouverait limitée par la nature cellulosique du papier, où les phénomènes de partage l'emportent généralement sur les phénomènes d'adsorption ou d'échange d'ions.

Pour pallier cet inconvénient, on chercha dans certains cas à imprégner le papier filtre, puis, plus récemment, le papier en fibres de verre, d'acide silicique ou d'alumine (66). La mise au point de papiers échangeurs à base de celluloses modifiées synthétiquement, ou l'emploi de papiers imprégnés de réactifs divers, ont encore étendu considérablement les possibilités de la chromatographie sur papier, sans cependant lui permettre de résoudre tous les problèmes et sans la rendre aussi universelle, qu'il était permis de l'espérer tout d'abord.

L'absence se faisait nettement sentir d'une technique micro-analytique, susceptible de mettre en jeu les mêmes phénomènes que la chromatographie sur colonne, grâce à l'utilisation des mêmes supports et des mêmes solvants, favorisant ainsi la transposition simple et rapide à l'échelle micro-analytique de techniques déjà éprouvées sur colonne, ou vice versa.

C'est probablement pourquoi vers 1950, Kirchner, Miller et Keller (67) s'occupèrent de façon plus approfondie de la technique sur couches minces en réalisant la séparation de terpènes sur des plaques très étroites ou « chromatostrips ». Puis, Mottier et Poterat (83) d'une part, Lagoni et Wertman (68) d'autre part fractionnèrent des mélanges de colorants hydrosolubles. En 1954, Reitsema (99) apportait une autre amélioration en remplaçant ces « chromatostrips », par des plaques plus larges ou « chromatoplates », sur

lesquelles il devenait possible de chromatographier plusieurs échantillons côte à côte et même de réaliser des chromatographies bidimensionnelles.

Mais c'est surtout aux remarquables travaux de E. Stahl, réalisés à partir de 1952 (119), que la chromatographie sur couches minces doit son essor actuel. Dans un ouvrage publié en 1962, intitulé « *Dünnschicht chromatographie* » (128, 129), en collaboration avec d'autres spécialistes, il traite de façon très détaillée, des modalités techniques de la méthode et de ses nombreuses applications dans tous les domaines de l'analyse chimique. Ce livre a puissamment contribué à la diffusion de la chromatographie sur couches minces, de même que celui de K. Randerath (98), traduit depuis en français et en anglais (*Thin-layer chromatography*). Enfin, en 1963 à Rome, un symposium, consacré à cette méthode de séparation (77), en a souligné encore les immenses possibilités. Grâce à l'utilisation, comme support, des substances les plus variées, minérales ou organiques, à pouvoir d'adsorption ou à capacité d'échange d'ions variables, la chromatographie sur couches minces a vu s'étendre d'une manière considérable le champ de ses applications. Compte tenu de sa rapidité d'exécution, de sa sensibilité et de sa simplicité technique, elle prend place, non seulement parmi les grandes méthodes physiques de séparation, mais également parmi les techniques courantes de tout laboratoire d'analyse.

La première partie de ce travail est consacrée à une mise au point bibliographique. Le chapitre premier résume les modalités techniques classiques de la méthode, tandis que le chapitre II rassemble les principaux résultats obtenus au cours de ces dernières années, complétant ainsi les ouvrages de base, déjà cités et publiés depuis deux ou trois ans.

La seconde partie, essentiellement expérimentale, relate en détail les recherches, que nous avons entreprises depuis trois ans et qui concernent de nouveaux aspects techniques de la chromatographie sur couches minces et les nouvelles possibilités offertes sur le plan analytique.

Elle comprend également deux chapitres, qui ont trait respectivement à l'utilisation :

— de couches minces de résines échangeuses d'ions, préparées selon la technique classique sur plaques de verre, ou présentées sous

forme de « *films ultramines* » adhérant à un support souple en polyester, inaltérable et transparent (*couches chromatographiques Kodak*) (chapitres I et III) ;

— de couches multiples successives, de nature différente et juxtaposées sur la même plaque de verre, permettant de réaliser une chromatographie continue, faisant appel au cours d'une même opération, aux pouvoirs séparateurs spécifiques de plusieurs supports successifs et susceptibles de mettre en jeu tour à tour l'adsorption, le partage, l'échange d'ions ou même des réactions chimiques variées (chapitre II).

PREMIERE PARTIE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE PREMIER

MODALITÉS TECHNIQUES CLASSIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

1. — CONFECTION DES COUCHES MINCES

LE procédé le plus couramment utilisé consiste à préparer tout d'abord, à l'aide d'un liquide approprié, une suspension homogène de la substance, dont on désire réaliser des couches minces et qui doit être pour cela à un degré de pulvérulence optimal. Cette suspension est étalée ensuite sur un support tel qu'une plaque de verre et l'appareillage employé pour cette opération appartient à deux types principaux : le premier est caractérisé par un dispositif d'étalement mobile, qui se déplace au-dessus des plaques de verre, maintenues par un dispositif de contention fixe (appareils Desaga, Shandon...) (*) ; le second type comprend un dispositif d'étalement fixe, sous lequel peuvent coulisser les plaques de verre, grâce à un système de guidage mobile ou non (appareils Camag, Pleuger, Touzart et Matignon...) (**).

(*) Desaga, Heidelberg (Rép. Féd. All.), importateur Roucaire, 21, rue des Favorites, Paris (15^e) ; Shandon (Angl.), importateur Prolabo, rue Pelée, Paris (11^e).

(**) Camag, Muttery (Suisse), importateur Paris-Labo, rue Cardinal-Lemoine, Paris (5^e) ; Pleuger-France, 27, rue Titon, Paris (11^e) ; Touzart et Matignon, 3, rue Amyot, Paris (5^e).

En outre, la plupart de ces appareils sont munis, quel que soit leur type, d'un dispositif permettant de faire varier, selon les besoins, l'épaisseur de la couche mince, de 200 microns jusqu'à deux millimètres environ.

D'autres modifications ou améliorations techniques ont été proposées et adaptées sur certains modèles et nous signalerons en particulier :

- un « niveleur » permettant d'aligner automatiquement dans le même plan les faces supérieures des plaques de verre quelles que soient leurs différences d'épaisseur (Shandon) ;

- un système d'entraînement automatique des plaques à vitesse constante, sous un réservoir à débit réglable (Marcucci et Mussini) (76) ;

- l'emploi de plaques de verre cannelées, comprenant une douzaine de stries longitudinales, profondes de 0,35 mm. et larges de 6 mm. La suspension se répartit dans ces cannelures et après séchage, les arêtes, noyées dans l'excès de substance, sont dégagées par abrasion (40).

Des procédés beaucoup plus simples ont encore, semble-t-il, les faveurs de nombreux expérimentateurs : certains consistent à étaler la suspension plus ou moins pâteuse à l'aide d'une simple baguette de verre (50, 33, 69), d'autres à immerger les plaques dans la suspension (89), d'autres enfin à pulvériser sur les plaques de verre la suspension de cellulose, de polyamide ou d'acide silicique (79, 5).

Il faut tout de même souligner que ces dernières méthodes ne permettent pas, en général, d'obtenir des couches minces d'homogénéité et d'épaisseur constantes.

Enfin, signalons la micro-technique fondée sur l'emploi de lames porte-objets de microscope, recouvertes de silice (53), ou de cellulose et utilisées en analyse biologique (95) ou toxicologique (146).

1°) PRÉPARATION DES PLAQUES.

Nous décrirons plus particulièrement la technique de Stahl, ainsi que l'appareillage construit par Desaga, car c'est à eux que nous avons eu recours pour nos recherches.

Les plaques de verre, utilisables pratiquement avec tous les appareils, ont un format standard, caractérisé par une dimension

constante (20 cm.) et une largeur variable de 5 cm. à 20 cm. et même 40 cm. Un gabarit en matière plastique permet de juxtaposer un certain nombre de plaques, en maintenant sensiblement dans un même plan leur face supérieure, destinée à recevoir la couche mince.

Afin de rendre l'adhérence de la couche mince sur le verre aussi parfaite que possible, il convient de soumettre les plaques à plusieurs lavages et rinçages successifs, d'abord avec une solution concentrée de soude, puis à l'eau distillée et, après séchage à l'étuve, juste avant l'emploi, à un dernier lavage à l'alcool et à l'éther.

Le dispositif d'étalement est un parallélépipède de métal, susceptible de glisser sur la face supérieure des plaques de verre et dont le réservoir intérieur est destiné à recevoir la suspension liquide à étaler. L'un des côtés de l'appareil est amovible et coulisse verticalement ; sa hauteur est ainsi réglable et permet de faire varier l'épaisseur de la couche mince, dont la plus couramment utilisée est d'environ 250 microns.

La suspension à étaler est préparée au mortier, en incorporant progressivement un certain volume d'eau distillée à la totalité de l'adsorbant. Lorsque les substances à mettre en suspension (Gel de silice, oxyde d'aluminium, kieselgühr, cellulose...) contiennent un peu de sulfate de calcium anhydre (gypse, plâtre), le temps d'agitation et d'homogénéisation ne doit pas dépasser une minute et demie, sous peine de voir le liquide se prendre en masse avant la fin de l'opération. La suspension est versée ensuite rapidement dans le réservoir de l'appareil et, par simple manœuvre d'un levier, elle est mise en contact avec la face supérieure de la première plaque de verre. Par un mouvement régulier de l'appareil elle est alors étalée progressivement sur les différentes plaques successives.

Les proportions employées varient suivant les substances utilisées et le nombre des plaques à recouvrir. A titre d'exemple, signalons que 25 g. de gel de silice, d'alumine ou de kieselgür sont habituellement mélangés à 50 ml. d'eau distillée, lorsque l'on désire recouvrir cinq plaques de 20 × 20 cm. d'une couche de 250 microns environ.

Afin de maintenir l'appareil en parfait état de fonctionnement en vue de toute opération ultérieure, il est indispensable, après chaque étalement, de le démonter et de le nettoyer soigneusement. Dans le but d'avoir une couche mince de surface toujours parfaitement régulière, il convient de veiller également à ce que la face

inférieure du côté réglable de l'appareil reste parfaitement lisse et unie ; cette face inférieure constitue en effet la limite supérieure de l'étroite fente, par laquelle s'écoule la suspension au cours de l'étalement et son intégrité conditionne la régularité de la couche mince. Examinée par transparence, la couche mince doit apparaître homogène et régulière et ne doit pas se détacher du verre lorsqu'on frotte doucement sa surface avec l'index.

Suivant la nature de la couche mince et surtout en fonction de son utilisation chromatographique ultérieure, le séchage des plaques doit être plus ou moins poussé. Lorsque l'on désire mettre en œuvre essentiellement des phénomènes de partage ou d'échange d'ions, une certaine quantité d'eau doit demeurer au sein de la couche mince et une simple dessiccation à l'air est alors suffisante. Par contre, lorsque l'on désire soumettre des substances peu solubles dans l'eau à une chromatographie d'adsorption vraie, à l'aide de solvants parfaitement anhydres, il convient de poursuivre la dessiccation des couches minces à l'étuve à 110°, pendant au moins trente minutes. Dans le cas des couches minces de nature minérale, certains auteurs préconisent de prolonger encore le séjour des plaques à l'étuve (trois à quatre heures) à une température supérieure à 110° ; l'activité des couches minces, ainsi obtenues, serait encore plus importante, mais leur conservation nécessite un stockage en atmosphère parfaitement anhydre (Dessicateur de grande capacité). Les autres plaques, soumises à une dessiccation moins poussée, peuvent être conservées simplement dans une armoire hermétique, qui les protège en même temps des vapeurs du laboratoire et de l'humidité.

2°) NATURE DES COUCHES MINCES.

En principe, toutes les substances solides employées en chromatographie sur colonne sont utilisables en couches minces à la condition primordiale qu'elles soient de grain assez fin. Il s'agit des adsorbants usuels qui jouent véritablement un rôle actif dans les processus de séparation (alumine, silice...), des échangeurs chimiques naturels et surtout synthétiques (résines échangeuses d'ions) ou encore de supports relativement inertes, au sein desquels les phénomènes de partage l'emportent (cellulose, poudre de verre...). Pour améliorer l'adhérence de la couche mince sur la plaque de verre, Stahl a préconisé l'addition de sulfate de calcium anhydre à la substance pulvérulente choisie. Cela est assez utile pour les couches

minérales à base d'alumine ou de silice ; par contre, les substances organiques comme la cellulose, les polyamides ou les polycarbonates, ont la plupart du temps une adhérence propre suffisante et permettent d'éviter l'emploi du plâtre, qui n'est pas sans inconvénients. On trouvera dans le tableau I la plupart des constituants habituels des couches minces utilisés en chromatographie classique.

La composition des couches minces peut être encore plus complexe et résulter par exemple du mélange de plusieurs constituants en proportions variables ; de même le traitement préalable de certaines poudres ou l'incorporation à la substance de solutions variées peuvent apporter souvent une amélioration remarquable de certaines séparations. C'est ainsi que l'on a utilisé avec succès, pour la séparation de substances à caractère acide, des plaques préparées avec du gel de silice trituré avec des solutions aqueuses d'acide oxalique 0,5 N (122) ou d'acide sulfurique à 2,5 pour cent (v/v). Pour des substances basiques, au contraire, on mélange l'acide silicique avec des solutions aqueuses de potasse à 0,1-0,5 N (122, 133) ou à des solutions tampons (132). Pour les caroténoïdes, on a proposé l'utilisation d'un mélange d'hydroxyde de calcium et de gel de silice (56, 149), alors que Egger (35) prépare des couches de kieselgühr imprégnées d'une solution de paraffine dans l'éther de pétrole 100-140° (8 pour cent p/v). Il semble toutefois que les meilleures séparations de lipides et de caroténoïdes aient été obtenues à l'aide de plaques de gel de silice imprégnées partiellement ou totalement d'undécane (solution à 15 pour cent dans l'éther de pétrole 40-60°) (61) ou de paraffine (5 pour cent dans l'éther de pétrole 30-40°) (62). Des plaques de gel de silice contenant 10 pour cent (p/p) de sulfate d'ammonium ont été préconisées pour la séparation de phosphatides et de dérivés d'acides gras (75). Des mélanges d'aldéhydes ont été résolus sur des plaques de gel de silice imprégnées de bisulfite de sodium ; alors que l'addition d'urée à l'adsorbant précédent a permis de séparer des carbures linéaires et saturés, les acides phénols sont susceptibles d'être chélatés par les ions tungstate et molybdate. Le gel de silice imprégné d'acide borique a permis à certains auteurs (87) de résoudre des mélanges de sucres, alors que Stahl (125) a eu recours à des couches de Kieselgühr tamponné. Notons enfin l'addition possible de substances fluorescentes, permettant l'examen des spots sous U.V.

TABLEAU 1 (129)

PRINCIPAUX CONSTITUANTS DES COUCHES MINCES

PRODUITS	ACIDITÉ	ACTIVITÉ (adsorbante)	MÉTHODE DE SÉPARATION	CATÉGORIES DE SUBSTANCES SÉPARÉES
Gel de silice	Acide	Actif	Adsorption partage (échange)	Pratiquement toutes
Oxyde d'aluminium	Basique	Actif	Adsorption partage (échange)	Principalement bases et stéroïdes
Kieselgühr	Neutre	Inactif	Partage	Sucres, produits pharmaceutiques, triglycérides, acides gras les plus élevés
Phosphate neutre de magnésium Trisilicate de magnésium Hydroxyde de calcium	Basique	Faiblement	Adsorption	Caroténoïdes
Phosphate de calcium	Faiblement basique	Actif		Tocophérols
Sulfate de calcium (64)		Faiblement actif	Adsorption	Hydrophobé pour acides gras et glycérides
Gel de silice + oxyde d'aluminium (1 + 1)	Acide + basique	Actif	Partage (échange)	Substances colorées acides barbituriques
Hématite hydraté		Actif	Adsorption	Substances polaires
Charbon		Actif	Adsorption	Substances non polaires
Poudre de cellulose	Pratiquement neutre	Aucune activité	Partage (échange)	Substances colorées Acide aminés
Polyamide	Neutre	Inactif	(Echange ?)	Flavones
Polyacrylnitrile	Neutre	Inactif	(Echange partage ?)	Anthocyanes
Echangeurs	Acide + basique	Inactif	Echange (partage)	Acides nucléiques

II. — DEVELOPPEMENT CHROMATOGRAPHIQUE. APPAREILLAGE

Nous décrirons plus spécialement la technique de chromatographie ascendante, qui est de loin la plus couramment utilisée et à laquelle nous avons fait le plus souvent appel au cours de nos recherches.

1°) CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE.

a) *Opérations préliminaires.* Un gabarit en plexiglass permet de travailler au dessus de la couche mince sans risque de la détériorer. Il comporte des points de repère et une échelle graduée, qui donnent la possibilité de cadrer les lignes de départ et d'arrivée et de marquer l'emplacement des divers dépôts de substance. Il est possible de graver très facilement sur la couche mince les renseignements relatifs à ces derniers, à l'aide d'une pointe métallique ou d'un crayon dur et pointu. A l'issue de la chromatographie, il est possible également par ce procédé de noter sur la plaque elle-même les caractéristiques de l'expérience réalisée : nature de la couche mince, solvants, durée, etc...

b) *Dépôt des substances.* L'échantillon à analyser doit être en solution à 0,1-1 ou 5 pour cent (p/p ou p/v). Un certain volume est déposé au point de départ à l'aide de micropipettes graduées, d'un volume total de 10 microlitres. Pour éviter la formation de queues derrière les spots, il est nécessaire d'opérer sur des quantités faibles de substances, dont l'ordre de grandeur varie d'ailleurs selon la nature de la couche mince : c'est ainsi qu'une couche d'acide silicique active de 250 microns d'épaisseur peut chromatographier correctement jusqu'à 1 mg. de produit, alors que si elle est inactive sa capacité ne sera que de 50 microgrammes ; si l'on s'adresse à de l'alumine peu activée, il sera possible de chromatographier environ 100 microgrammes de substance. Les solutions des différents produits à analyser sont déposées sur une ligne de départ horizontale, perpendiculairement au sens de migration, à 1,5 ou 2 cm. d'un bord de la plaque. Les dépôts seront d'autre part effectués à 1, 1,5 ou 2 cm. les uns des autres. Il est indispensable de réaliser des tâches d'un diamètre aussi petit que possible et lorsqu'en raison de la faible concentration de la solution, on se trouve obligé de déposer une trop grande quantité de liquide, il est préférable d'effectuer plusieurs

dépôts successifs en laissant sécher le liquide chaque fois. Des seringues à vis micrométrique permettent, lors des travaux quantitatifs, d'opérer sur une quantité très petite et très exacte de solution.

c) *Cuves de développement.* On utilise le plus souvent des récipients en verre rectangulaires ou cylindriques, susceptibles d'être hermétiquement clos, grâce à des couvercles rodés. Dans la cuve parfaitement propre et sèche, on verse une quantité suffisante de solvant pour obtenir une couche de liquide de 0,5 à 1 cm. d'épaisseur. Pour atteindre rapidement une saturation complète de l'atmosphère de la cuve, on dispose sur ses parois latérales des feuilles de papier filtre imbibées de solvant et trempant également dans celui-ci à leur partie inférieure. Cette saturation par les vapeurs de solvant est absolument nécessaire, si l'on veut éviter, comme dans la chromatographie sur papier, tous les phénomènes marginaux ; elle permet également de diminuer les temps de préparation et l'obtention de résultats reproductibles. Dès que le dépôt de la prise d'essai est effectué et que le liquide est évaporé, on plonge la chromatoplaque dans la cuve, remplie du solvant désiré, par son extrémité la plus proche de la ligne de dépôt. Un support polyvalent spécial permet de mettre plusieurs plaques carrées de 20×20 dans la même cuve et d'effectuer ainsi plusieurs expériences en série. Dans ce dernier cas, il faut veiller à ce que l'écartement des plaques verticales et parallèles soit au minimum de 0,5 cm. ; de plus, pour assurer une saturation normale de l'atmosphère comprise entre ces dernières, il est recommandé d'appliquer au dos de chaque plaque une feuille de papier filtre trempant également dans le solvant. Une distance totale de migration de 10 cm. est en général suffisante, pour obtenir dans la plupart des cas une bonne séparation. Le solvant monte par capillarité au sein de la couche mince et sa migration s'effectue très rapidement, surtout s'il s'agit d'un solvant organique anhydre et d'une couche mince activée de silice ou d'alumine. Lorsque le front du solvant a atteint le niveau assigné, les chromatoplaques sont sorties et séchées soit à la température ambiante, soit à l'étuve ou à l'aide d'un séchoir. Pendant le développement de la chromatographie, il est préférable de préserver les cuves du soleil ou des variations de température. La lumière ou l'oxygène de l'air peuvent entraîner parfois des modifications chimiques des substances à analyser ; on y remédie en protégeant la cuve de la lumière et en remplaçant l'atmosphère intérieure par de l'anhydride carbonique ou de l'azote. Pour améliorer la saturation de la chambre en dimi-

nuant son volume, Stahl (129) a mis au point un système spécial ou « S. Kammersystem » : la face inférieure de la plaque dépourvue d'adsorbant constitue l'un des grands côtés de cette cuve ; l'autre est une plaque vierge identique. Les deux plaques sont maintenues à quelques millimètres de distance l'une de l'autre par des baguettes de verre situées entre les deux faces intérieures. La couche mince est également située sur l'une de ces faces intérieures. L'ensemble, maintenu par des pinces, constitue une cuve ouverte à sa partie inférieure, que l'on place dans une gouttière remplie de solvant. Un système analogue, mais plus simple, a été proposé par Davies (26).

d) *Solvants*. Une chromatographie d'adsorption fait appel à trois paramètres au moins : activité de l'adsorbant, polarité du solvant, polarité des molécules à fractionner. La gamme des couches adsorbantes étant relativement limitée, seul le choix des solvants, qui offre des possibilités infinies, permettra une étude rationnelle des conditions expérimentales. En général, sur des adsorbants polaires le pouvoir d'élution d'un solvant augmente avec son caractère hydrophile, sa tension superficielle et sa constante diélectrique. De nombreux auteurs ont dressé des listes de solvants, en fonction des variations de leur pouvoir éluant, que l'on appelle encore « Séries éluotropes ». Citons en particulier celles de Trappe (135), Strain (131), Jacques et Mathieu (58), Hess (51), et Stahl (138).

Pouvoir éluotrope croissant ↓	Solvant	Constante diélectrique à 20°
éther de pétrole		
cyclohexane		
tétrachlorure de carbone		
trichloroéthylène		
toluène	n-hexane	1,890
benzène	heptane	1,924
dichlorure de méthylène	cyclohexane	2,023
chloroforme	tétrachlorure de carbone	2,238
diéthyléther	benzène	2,284
acétate d'éthyle	chloroforme	4,806
pyridine	diéthyléther	4,340
acétone	acétate d'éthyle	6,020 (à 25°)
n-propanol	pyridine	12,3 (à 25°)
éthanol	acétone	20,7 (à 25°)
méthanol	éthanol	24,3 (à 25°)
eau	méthanol	33,62
	eau	80,37

Série éluotrope de Trappe

Série éluotrope de Stahl

Un mélange de deux ou trois solvants de polarités différentes a une efficacité plus grande qu'un solvant pur. Neher et Arx (85) ont proposé une série éluotrope comprenant à la fois des solvants purs et des mélanges binaires.

Pour avoir une idée générale sur le pouvoir séparateur d'un solvant, on utilise une technique chromatographique horizontale micro-circulaire (120). On effectue plusieurs dépôts de la solution de composés à fractionner à quelques centimètres les uns des autres, sur une couche de l'adsorbant choisi. Après évaporation, on fait arriver au centre de l'une des taches et au moyen d'un fin capillaire, le solvant à tester, qui s'étale peu à peu circulairement en séparant éventuellement les constituants du mélange sous forme de spots circulaires concentriques. On essaye successivement plusieurs solvants en suivant la série éluotrope. Les solvants choisis doivent évidemment être très purs, parfois même redistillés avant l'emploi.

Série éluotrope de solvants à une ou deux composantes (v/v) (85)
(les chiffres indiquent les volumes.

La colonne de droite est la suite de celle de gauche).

Pouvoir éluotrope croissant ↓	Benzène	↓	Cyclohexane-acétate d'éthyle (2/8)
	Benzène-chloroforme (1/1)		Acétate de butyle
	Chloroforme		Chloroforme-méthanol (95/5)
	Cyclohexane-acétate d'éthyle (8/2)		Chloroforme-acétone (7/3)
	Chloroforme-acétone (95/5)		Benzène-acétate d'éthyle (3/7)
	Benzène-acétone (9/1)		Acétate de butyle-méthanol (99/1)
	Benzène-acétate d'éthyle (8/2)		Benzène-éter (1/9)
	Chloroforme-éter (9/1)		Ether-méthanol (99/1)
	Benzène-méthanol (95/5)		Ether
	Benzène-éter (6/4)		Ether-diméthylformamide (99/1)
	Cyclohexane-acétate d'éthyle (1/1)		Acétate d'éthyle
	Chloroforme-éter (8/2)		Acétate d'éthyle-méthanol (99/1)
	Benzène-acétone (8/2)		Benzène-acétone (1/1)
	Chloroforme-méthanol (99/1)		Chloroforme-méthanol (9/1)
	Benzène-méthanol (9/1)		Dioxane
	Chloroforme-acétone (85/15)		Acétone
	Benzène-éter (4/6)		Méthanol
	Benzène-acétate d'éthyle (1/1)		Dioxane-eau (9/1)
	Chloroforme-éter (6/4)		

2°) AUTRES MODES DE DÉVELOPPEMENT.

La plupart des autres techniques chromatographiques classiques sont susceptibles d'être réalisées en chromatographie sur couches minces. Sans entrer dans les détails, nous les passerons cependant brièvement en revue.

a) *Chromatographie descendante*. Stanley, Vannier et Gentili (130) ont décrit un appareil qui permet d'opérer sur des chromatoplaques de largeurs variables. Le solvant, qui se trouve dans un bac gouttière situé à la partie supérieure de l'appareil, est drainé jusqu'à la couche chromatographique par l'intermédiaire d'une bande de papier filtre. Un étrier plaque le papier sur les chromatoplaques, maintenues en position pratiquement verticale.

Récemment Turina et coll. (137) ont décrit un nouvel appareil, permettant d'effectuer la chromatographie sur couches minces en continu. Deux des côtés d'une chromatoplaque triangulaire sont alimentés chacun par un solvant différent. Le mélange à analyser est déposé près du sommet. Les différentes fractions s'écoulent de la plaque par sa base, le tout étant incliné à 45°.

b) *Chromatographie horizontale*. Dans la technique circulaire (121), la chromatoplaque percée d'un trou central est posée sur une cuvette de même diamètre remplie de solvant. La liaison entre le solvant et la couche est assurée par une mèche de coton. Le mélange de substances à analyser est déposé de façon ponctiforme dans un rayon de 1 cm. environ autour du point d'arrivée du solvant. La couche mince peut être orientée soit vers le bas, soit vers le haut, mais dans ce dernier cas, on place, à quelques millimètres au-dessus de la couche, une plaque de verre formant couvercle pour empêcher l'évaporation du solvant.

Dans la technique horizontale à chambre fermée (129), le solvant est placé dans un bac de verre avec couvercle. Couche chromatographique tournée vers le bas, la plaque repose sur deux baguettes de verre, dont l'une est recouverte d'une feuille de papier filtre qui trempe dans le solvant et en est le vecteur.

Brenner et Niederwieser (17) ont mis au point, pour la technique dite « de passage », une chambre BN qui s'apparente à la chambre S. Un couvercle de verre repose au-dessus de la chromatoplaque dégarnie sur deux bandes latérales de 1 cm. environ. Les deux extrémités de la cuve ainsi constituée sont ouvertes. D'un côté,

arrive le solvant, par l'intermédiaire d'un papier filtre, trempant dans un réservoir. L'autre ouverture permet au solvant de s'évaporer après la traversée de l'adsorbant, de telle sorte que la phase mobile « s'écoule » de façon continue. On obtient ainsi une meilleure résolution des substances à Rf voisins.

c) *Chromatographie centrifuge sur couches minces*. Rosmus, Pavlicek et Deyl (101) réalisent des couches minces d'adsorbants sur des disques d'aluminium qui s'adaptent ensuite sur un dispositif de centrifugation. La méthode de développement est identique à celle des procédés classiques sur papier. Dans leur technique, l'arrivée du solvant est centrale et la vitesse d'écoulement deux à trois fois moindre que dans la chromatographie centrifuge sur papier. Les couches d'adsorbants sont confectionnées suivant la technique habituelle à l'aide d'un support spécial, qui peut contenir deux disques d'aluminium.

d) *Electrophorèse sur couches minces*. La méthode employée est analogue à celle de l'électrophorèse sur papier. On prépare des couches de nature variable à l'aide des substances habituelles et il est également possible de réaliser des couches tamponnées, en remplaçant l'eau par une solution tampon, au cours de la préparation de la masse à étaler. Avant usage, les plaques doivent être humidifiées de façon régulière ; pour cela, on vaporise de l'eau ou une solution tampon jusqu'à obtention d'une couche translucide. Parmi les appareils utilisés, on peut citer ceux de Honegger (54), Pastuska et Trinks (88) ou Ramsey (94).

3°) MODALITÉS TECHNIQUES DIVERSES.

a) *Développements répétés. Technique par étape*. Au cours d'une chromatographie ascendante, il arrive que les substances à séparer restent dans le secteur des Rf inférieurs à 0,5 tout en amorçant cependant une ébauche de séparation. On peut alors, pour résoudre le mélange, soit passer à une chromatographie horizontale en chambre BN, soit replacer après séchage intermédiaire, la même chromatoplaque, dans la même cuve avec le même solvant (90). On peut d'ailleurs répéter cette opération plusieurs fois de suite.

Au contraire, lorsqu'un premier solvant n'a pu réaliser la séparation que d'une partie seulement des substances du mélange, on utilise la technique par étape, qui consiste à effectuer plusieurs

développements dans la même direction, avec chaque fois un solvant différent (122).

b) *Technique des bandes en cônes*. Elle a été adaptée à la chromatographie sur couches minces par Stahl (121). Il suffit de tracer des traits sur la couche de sorption afin d'obliger le solvant et les substances à séparer, à remonter dans une sorte d'étranglement pendant les premiers centimètres de la migration. On oblige ainsi les substances à progresser sur une piste étroite et de dimensions fixées. Prey et collaborateurs (92) ont décrit également une technique de bandes en V.

c) *Chromatographie bidimensionnelle sur couches minces*. La chromatographie bidimensionnelle sur couches minces, comme celle sur papier, permet une analyse plus poussée de mélanges complexes. Un début de séparation est d'abord réalisé dans une première direction, puis après séchage et rotation de la chromatoplaque de 90°, on termine la chromatographie dans la direction perpendiculaire. Il y a tout intérêt, en général, à ce que les solvants comme les phénomènes qui régissent la séparation soient différents dans les deux sens (adsorption-partage).

d) *Technique des gradients*. Un dispositif mis au point par Wieland (147) permet de modifier progressivement la composition de l'éluant au cours de la migration ; on peut, en particulier faire varier progressivement le pH de l'éluant tout au long de la chromatographie.

e) *Technique SRS ou « séparation-réaction-séparation »* (123). On réalise une chromatographie bidimensionnelle en opérant dans des conditions absolument identiques dans les deux directions (solvants, température, etc...), mais entre les deux opérations, avant de passer de la première à la deuxième dimension, on soumet la substance, dont on veut étudier la stabilité, à l'action d'un rayonnement, d'un gaz ou d'un réactif vaporisé. Les taches qui ne sont pas altérées doivent se trouver sur la diagonale formée par les directions de parcours 1 et 2. Si d'autres dérivés ont pris naissance sous l'action de réactifs physiques ou chimiques, on observe des spots dont les positions présentent un écart notable avec la diagonale.

III. — DETECTION ET DOSAGE DES SUBSTANCES SEPARÉES SUR COUCHES MINCES

D'une façon générale, tous les réactifs spécifiques, mis au point et utilisés en chromatographie sur papier, peuvent être employés en chromatographie sur couches minces. Toutefois, les couches adsorbantes de nature purement minérale, alumine ou silice, apportent un avantage appréciable. Elles permettent d'utiliser des réactifs très agressifs, tel que l'acide sulfurique concentré, qui, à des températures relativement élevées (120°), provoque une destruction des matières organiques avec noircissement des spots.

Une infinité de réactions chimiques permettent de visualiser les spots des substances incolores, en transformant ces dernières en dérivés différemment colorés. On trouvera une liste importante de réactifs dans l'ouvrage de Stahl (143) et, dans le chapitre suivant, de nombreux exemples d'applications analytiques de la chromatographie sur couches minces classique.

Au point de vue quantitatif, une mesure de l'aire des taches, ainsi obtenues, peut être réalisée soit au planimètre, à l'aide de papier millimétré ou d'un gabarit quelconque, soit par procédé de contact photographique ou par pesée d'un calque obtenu sur un papier cartonné de densité homogène (2).

Si la coloration est proportionnelle à la concentration, on peut effectuer des mesures quantitatives au spectrophotomètre, soit en lumière monochromatique réfléchie pour des couches minces opaques, soit en lumière transmise, quand il est possible de rendre les couches translucides.

De nombreuses substances sont visibles par absorption ou fluorescence, quand on les expose à la lumière ultra-violette et l'on peut réaliser ainsi des opérations qualitatives et des mesures quantitatives. On peut encore améliorer la sensibilité en incorporant un indicateur fluorescent à la masse de l'adsorbant.

Enfin, l'utilisation des radioisotopes rend possible la mise en œuvre des techniques de détection radio-actives les plus diverses.

— Les émetteurs gamma, sont caractérisés d'après l'énergie de leur rayonnement à l'aide d'un détecteur à cristal d'iodure de sodium activé au thallium et couplé à un montage spectrométrique. Pour les émetteurs bêta purs, surtout de faible énergie, on utilise un compteur Geiger-Müller à fenêtre mince. On détermine la nature

de l'émetteur en interposant des écrans métalliques d'épaisseur déterminée.

— L'autoradiographie des spots de la plupart des radioisotopes utilisés permet à la fois une détermination qualitative et souvent même une mesure photométrique quantitative du noircissement des films (39).

— A côté de ces méthodes classiques il faut noter le procédé de scintillation en milieu semi-liquide décrit par Roucayrol (102), qui en association avec Berger et Meyniel (103) ont montré que le rendement de ce procédé était bien supérieur pour la plupart des émetteurs bêta séparés sur couches minces.

— Dans le cas rare d'émetteurs alpha purs, la chromatographie sur couches minces est à rejeter, l'autoadsorption importante de la particule alpha par la couche mince rendant toute mesure quantitative illusoire.

On peut également effectuer des mesures qualitatives et quantitatives, après avoir gratté la zone de la couche adsorbante correspondant à chaque spot. Après élution et centrifugation, on soumet les fractions pures ainsi obtenues à l'analyse spectrale ou microchimique.

Enfin, notons qu'il est souvent utile de conserver les chromatogrammes aussi fidèlement que possible. On dispose à cette fin de plusieurs techniques : photographie, photocopie, héliographie et papier calque.

On peut également décoller du verre la totalité de la couche mince, après traitement spécial et la conserver comme un chromatogramme sur papier.

CHAPITRE II

APPLICATIONS ANALYTIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES CLASSIQUES

A l'origine, le domaine de la chromatographie sur couches minces s'est limité essentiellement à celui des substances liposolubles de faible polarité. Elle représentait en effet un moyen rapide et souple pour effectuer certains travaux de contrôle et pour mener à bien des investigations préliminaires avant la mise en train d'une chromatographie sur colonne. La chromatographie sur couches minces semblait ne devoir jamais pénétrer dans le domaine de la chromatographie de partage. Il paraissait impossible en effet de séparer à l'aide de cette nouvelle méthode des familles chimiques aussi importantes que les sucres et les acides aminés, ou de fractionner des séries homologues, dont le coefficient de partage des constituants varie proportionnellement à la longueur de la chaîne.

Les premières applications analytiques portèrent le plus souvent sur des produits du règne végétal (baumes, cires, goudrons, résines, stéroïdes, tanins, huiles essentielles, etc...), ainsi que sur divers mélanges de phénols, d'azulènes, de peroxydes organiques et de dérivés coumariniques.

On a cherché cependant peu à peu à adapter aux couches minces les principes de la chromatographie de partage et dès 1956-1957

Stahl montrait qu'en utilisant des solvants de plus en plus polaires, on réussissait à séparer des mélanges de glucosides et d'alcaloïdes. Le premier exemple fut la séparation d'un mélange de 5 alcaloïdes de solanacées, à l'aide du butanol saturé d'acide acétique.

Toute une série de travaux parurent ensuite, confirmant ces résultats et même les élargissant. Ce furent les succès obtenus par Mutschler et Rochelmeyer, puis par Brenner et Niederwieser dans la séparation des acides aminés. Enfin, Stahl et Kaltenbach ont récemment réussi à séparer des mélanges de substances organiques aussi hydrophiles que les sucres.

La technique sur couches minces semble donc pouvoir désormais s'adapter à tous les types de chromatographie et s'appliquer quasi universellement à toutes les branches de l'analyse.

Dans les pages suivantes, nous avons résumé, sous forme de tableaux, les principales applications de la chromatographie sur couches minces, réalisées au cours de ces dernières années. Nous avons envisagé successivement les ions minéraux, les sucres et dérivés, les lipides, les amino-acides, les acides nucléiques et nucléotides, les alcaloïdes, les vitamines, les stéroïdes, les médicaments et enfin quelques groupes de diverses substances.

Sur ces tableaux, sont mentionnés dans l'ordre, les noms d'auteurs avec la référence bibliographique, la nature des composés séparés, le support puis le solvant et enfin la technique de révélation utilisée.

Parmi les nombreuses utilisations déjà connues et publiées, nous avons dû nécessairement faire un choix. Nous nous sommes limités aux travaux les plus récents ou à ceux qui nous ont semblé les plus significatifs. On trouvera dans les deux ouvrages de base déjà cités (98-129), ainsi que dans d'autres monographies (29-30-46-118) de nombreux exemples et renseignements complémentaires.

TABLEAU 2

IONS MINÉRAUX

(111) SEILER H. SEILER M. 1960	<i>Groupe H_2S</i> Cu^{++}, Pb^{++}, Cd^{++}, Bi^{+++}, Hg^{++}. <i>Groupe $(NH_4)_{2}S$</i> Al^{+++}, Ni^{++}, Cr^{+++}, Mn^{++}, Co^{++}, Zn^{++}, Fe^{+++}.	Gel de Silice G.	Butanol..... 100 HCl 1,5 N 20 Acétonylacétone 0,5	K I 2 % Vapeurs d'ammoniaque H_2S
(112) SEILER H. ROTHWEILER W. 1961	<i>Métaux alcalins</i> Na^+, K^+, Li^+, (Mg^{++}).		Ethanol anhydre 100 Ac. acétique. ... 1	Ac. « violurique » 100° C. 20 mn.
(113) SEILER H. KAFFENBERGER T. 1961	<i>Halogènes</i> Cl^-, Br^-, I^-, F^-.	Gel de Silice G.	Acétone..... 65 N Butanol. 20 NH_4OH conc.. . 10 Eau. 5	0,1 % pourpre de bromocrésol dans l'éthanol + NH_4OH dilué jusqu'au virage.
			$AgNO_3$ ammoniacal 1 % + fluorescéine dans l'alcool 0,1 % + U. V. Cl^-, Br^-, I^-	0,1 % laque de zirconium alizarine en milieu fortement chlorhydrique.

TABLEAU 2

IONS MINÉRAUX (suite)

(114) SEILER H. 1961	Phosphates $H_2P_2O_7^{2-}$, $H_2PO_4^-$, $H_2PO_3^-$, $H_2PO_2^-$.	Gel de Silice + amidon	Méthanol 50 NH_4OH conc. . . 15 Ac. trichloroacétique à 10 % 5 Eau 30	Molybdate d'ammonium 1 % puis Chlorure stanneux 1 % dans HCl 10 %
(115) SEILER H. 1962	Alcalino-terreux Sr^{++} , Ba^{++} , Ca^{++} .	Gel de Silice + amidon	Ethanol 37,5 N propanol 37,5 Ac. acétique. . . . 5 Acétylacétone . . . 1 Eau distillée 20	Ac. « violurique » 100° C. 20 mn.
(137) TURINA S. MARJANOVIC KRAJOVAN V. OBRADOVIC M. 1964	Fe^{+++} , Co^{++} .	Gel de Silice G.	Méthanol 8 Ac. Chlorhydrique 1 Eau 1 d'un côté de la plaque Acétone de l'autre côté de la plaque	

(125) STAHL E. KALTENBACH U. 1961	Lactose, saccharose, glucose, fructose, D. xylose, D. ribose, L. ramnose, D. digitoxose.	Kieselgühr tamponné à l'acétate de sodium.	Acétate d'éthyle Isopropanol 2.... } 65 Eau 1. } 35	Aldéhyde anisique + Ac. sulfurique
(93) PREY V. BERBALK H. KAUSZ M. 1962	Glucose alpha-méthyl glucoside 2.0. méthyl-glucose 3.0. méthyl-glucose 6.0. méthyl-glucose	Gel de Silice G.	N butanol..... 4 Acétone..... 5 Eau..... 1	Naphto-résorcinol + Ac. phosphorique
(81) MILDRED GEE 1962	Saccharose Raffinose	Gel de Silice G.	Alcool isopropylique 10 Toluène..... 2 Acétate d'éthyle 5 Eau..... 2,5	Naphtorésorcinol à 0,2 % dans l'acétone 5 Ac. phosphorique à 9 % 1
(27) DEFERRARI J.O. MUCHNICK R. MATSUHIRO B. SPROVIERO J.F. 1962	Dérivés benzoylés du pyranose Dérivés acétylés du pyranose	Ac. silicique - amidon	Chloroforme ... 3 Benzène. 7 Méthanol 2 Benzène 98	Nitrate d'argent Ammoniaque Méthylate de soude 110° C. 10 mn.
(109) SCHWEIGER A. 1962	Mannose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose, Ribose, Rhamnose, Ac. glycuron., Ac. galacturonique.	Cellulose	Acétate d'éthyle 2 Pyridine..... 1 Eau..... 2	Anisidine Ac. phtalique Ethanol 96 %
(100) RINK M. HERMANN S.	<i>Sucre dans les urines</i> Fructose, Arabinose, Lactose, Glucose.	Gel de Silice G. préparé avec de l'acide borique 0,1 M	N Butanol 40 Acétone..... 50 Ac. borique 0,1 M 10	Naphtorésorcin Ac. sulfurique
(82) MILDRED GEE 1963	Dérivés méthylés du fructose, arabinose, galactose, galactopyranose glucose, maltose, manno- pyranose et xylose.	Gel de Silice G.	Éther éthylique. 2 Toluène..... 1	H ₂ SO ₄ 50 % 110° C. 20 mn.

TABLEAU 4

LIPIDES

(60) KAUFMANN H.P. MAKUS Z. 1960	<i>Ac. gras saturés</i> Ac. laurique Ac. myristique Ac. palmitique Ac. stéarique Ac. arachidique Ac. béhénique <i>Ac. gras non saturés</i> Ac. linoléique Ac. linoléique Ac. oléique Ac. érucique	Gel de Silice G. imprégné d'undécane	Ac. acétique 1 Acétonitrile 1 saturé à 70 % d'undécane.	Acide phosphomolybdique
(63) KAUFMANN H.P. SU KO Y. 1961	Ac. linoléique Ac. linoléique Ac. oléique Ac. érucique Alcool laurique Alcool oléique Alcool érucique	Gel de Silice G. (1^{re} dimension) Gel de Silice G. imprégné d'undécane (2^e dimension)	Dichloroéthane (1^{re} dimension) Acétone 1 Acétonitrile 1	Ac. phosphomolybdique
(63) KAUFMANN H.P. SU KO Y. 1961	Ac. 2 hydroxystéarique Ac. 2 hydroxyarachidique Ac. 2 hydroxybéhénique Ac. stéarique Ac. arachidique Ac. béhénique	Kieselgühr G. imprégné de tétradécane	Ac. acétique 90 Eau 10 saturé à 70 % de tétradécane	Rhodamine B.

LIPIDES (suite)

(140) WAGNER H. HÖRHAMMER L. WOLFF P. 1961	Lysocithine Sphingomyéline Lécithine Céramine-Céphaline Cérébroside Cardiolipine	Gel de Silice G.	Chloroforme Méthanol Eau.	65 25 4	Rhodamine B. dans l'éthanol R. de Dragendorff
(73) MANGOLD KAMMERBECK MALINS 1963	Lipides marqués à ^{14}C , ^3H et ^{131}I Acides laurique, myristique palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linolénique.	Gel de Silice G.	Ether de pétrole ... Ether éthylique. ... Ac. acétique.	90 10 1	Auto-radiographie
(136) TUNA N. MANGOLD H.K. MOSSER D. 1963	Contrôle de Trioléine commerciale et de Trioléine purifiée, mar- quées à ^{131}I .	Gel de Silice G.	Ether de pétrole ... Ether éthylique. ... Ac. acétique.	90 10 1	Auto-radiographie
(73) MANGOLD KAMMERBECK MALINS 1963	Esters méthyliques de l'huile de ricin, marqués à ^{14}C .	Gel de Silice G.	Ether de pétrole ... Ether éthylique. ... Ac. acétique.	70 30 2	Auto-radiographie

AMINO-ACIDES

(36) FAHMY A.R. NIEDERWIESER A PATAKI G. BRENNER M. 1961	Lysine, Hydroxy-lysine, Ac. glutamique, Sérine, Glycocolle, Cystine-SO ₃ H, Ac. aspartique, Thréonine, Alanine, Arginine, bêta-alanine, Histidine, Hydroxy-proline, Proline, Méthionine, Valine, Tyrosine, Leucine, Phényl-alanine, Tryptophane.	Gel de Silice G. <i>Avant le développement</i> oxydation à l'acide per- formique qui transforme la cystéine et la cystine en acide cystéique plus stable. L'oxydation transforme la méthionine en méthionine-sulfone.	Chloroforme 2 Méthanol 2 Ammoniaque 17 %.. 1 (1 ^{re} dimension) Phénol..... 75 Eau. 25 (2 ^e dimension)	Ninhydrine
(16) BRENNER M. NIEDERWIESER A PATAKI G. 1961	Dinitro-phényl- amino-acides.	Gel de Silice G.	Toluène..... 100 Pyridine..... 30 Chl /éthylène. 60 NH ₄ OH 0,8 N..... 60 (1 ^{re} dimension) Chloroforme. 70 Alc. benzylique..... 30 Ac. acétique. 3 (2 ^e dimension)	U. V.
(147) WIELAND T. LÜBEN G. DETERMANN H. 1962	Lactico-déshydrogénases I et II extraites du cœur de bœuf.	D.E.A.E. — Séphadex.	<i>Technique des gradients</i> Tampon phosphate à pH : 7,2 (sol. aqueuse) Le même tampon conte- nant du NaCl M.	D.P.N.H. / ac. pyruvique
(150) WOLLENWEBER P. 1962	Alanine Leucine Asparagine Méthionine Ac. aspart. Tryptophane Cystine Tyrosine Ac. glutam. Valine Isoleucine	Cellulose	N. Butanol 4 Ac. acétique. 1 Etu 5 Phase supérieure	Ninhydrine 0,3 gr. Méthanol 95 ml. Collidine 5 ml.

ACIDES NUCLÉIQUES — NUCLEOTIDES

(96) RANDERATH K. 1962	Adénine Adénosine Hypoxanthine Inosine Uracil Uridine 6-chloropurine	Cellulose	H ₂ O distillée	U. V.
	3' AMP 2' + 3' UMP 2' AMP 5' AMP 3' GMP ADP 2' GMP ATP 2' + 3' CMP	Cellulose G.	Sulfate d'ammonium saturé 80 Acétate de sodium M 18 Isopropanol 2	U. V.
(97) RANDERATH K. 1962	5' AMP GDP ADP CDP ATP UDP 5' GMP GTP 5' CMP CTP 5' UMP UTP	DEAE Cellulose	HCl 0,02 N	U. V.
	ATP CTP GTP UTP		HCl 0,04 N	

TABLEAU 7

ALCALOÏDES

(133) TEICHERT K. MUTSCHLER E. ROCHELMEYER H. 1960	Spartéine Coniine Anabasine Nicotine Arécoline	Gel de Silice G. « alcalin » (+ KOH 0,5 N)	Chloroforme 9 Ethanol 96 % 1 Chloroforme, 8 Ethanol 96 % 2	Dragendorff
(3) BAUMLER J. RIPPSTEIN S. 1961	Atropine Brucine Strychnine Quinine Nicotine Novocaïne Narcéine Dionine Morphine Cocaïne Procaine Caféine Antipyrine Résérpine Thébaïne Codéine Narcotine Papavérine	Gel de Silice G.	Méthanol 1 Acétone, 1 Triéthanolamine ... 0,03	U. V. R. de Dragendorff modifié par Munier.
(141) WALDI D. SCHNACKERZ I. MUNTER F. 1961	Atropine Homatropine Apoatropine Cocaïne Scopolamine Scopoline Tropacocaïne	Alumine G.	Cyclohexane, 30 Chloroforme, 70 Diéthylamine, 0,05	U. V. Réactif à l'iodoplatinate.

ALCALOIDES (suite)

(127) STAHL E. PAECH K. TRACEY M.V. 1962	Alcaloïdes de l'Ipeca	Gel de Silice G.	Chloroforme 85 Méthanol 15	Solution chloroformique d'iode puis U. V.
(105) RUSIECKI W. HENNENBERG M. 1963	Strychnine Brucine en Toxicologie	Gel de Silice G. Brucine oxydée au point de départ par 1 goutte de $K_2Cr_2O_7$ saturé.	Butanol..... 150 HCl conc. 30 Eau qsp saturation	R. de Bouchardat
(86) PARIS R.R. PARIS M. 1963	Conessine Holarrhénine Fagarine Chélidonine Cépharantine Cytisine Lupanine Sarrothammnine Spartéine.	Gel de Silice. 87 $CaSO_4$ 13 Alumine G.	Acétate d'éthyle ... 77,5 Hexane 17,5 Diéthylamine, 5	R. de Draggendorff modifié par Mumier U. V.
(55) IKRAM M. KHU'DA-BAKISH M. 1964	Alcaloïdes de Solanacées Atropine Hyoscyamine Hyosine	Alumine	Méthanol	Draggendorff Dosage acidimétrique après grattage de la zone d'alumine corres- pondante et élution par le chloroforme.

TABLEAU 8

VITAMINES

(41) GÄNSHIRT H. MALZACHER 1960	<i>Vitamines hydrosolubles.</i> B1, B2, B6, B12, Ac. Ascorbique (Vit. C) Panthothénate de calcium Nicotinamide Biotine	Gel de Silice G. avec indicateur de Fluorescence (ZS Super)	Benzène Méthanol Acétone Ac. acétique Développement à l'abri de la lumière.	70 20 5 5 Dichlorobenzoquinone + Chlorimide + vap. d'ammoniac. (B6)	U. V. (B1, B2, C) U. V. + iodoplatinate de potassium. (Biotine, B1, C, PP)
(74) MANGOLD H.K. MALINS D.C. 1960	Huiles de foie de poissons Esters de stérols, Esters vitamine A Glycérides Acides gras.	Gel de Silice G.	Ether de pétrole . . . Ether éthylique . . . Ac. acétique crist. . .	90 10 1	Carbonisation à chaud avec le mélange sulfo- chromique.
(110) SEHER A. 1961	Triméthyl-Tocophérol Diméthyl-Tocophérol Méthyl-Tocophérol	Gel de Silice G.	Chloroforme		Acide phosphomolybdique + Ammoniac gaz.
(91) PLANTA C. SCHWIEFER U. CHOPARD L. RUEGG R. KOFER M. ISLER O. 1962	<i>Vitamines liposolubles.</i> Vitamine A Isomères : 11 cis 13 cis 9, 13 di-cis 11, 13 di-cis	Gel de Silice G.	Pétrole léger Méthyl-hepténone . . .	11 2	U. V.

VITAMINES (suite)

(104) RUEGG R. ISLER O. 1962	Vitamines K.	Gel de Silice G. imprégné de paraffine	Acétone..... 95 Eau. 5	Acide Sulfurique concentré. 130° C.
(15) BOLLIGER H.R. 1962	béta-Carotène Vitamine A (palmitate) — (acétate) — (alcool) Vitamine K1 Vitamine D2 alpha-Tocophérol	Gel de Silice G. avec indicateur de fluorescence.	Cyclohexane..... 80 Ether éthylique. ... 20	U. V.
(25) DAVID S. HIRSHFELD H. 1963	Thiamine Mono-phosphate de Thiamine Di-phosphate de Thiamine Tri-phosphate de Thiamine	Cellulose MN 300 G.	N propanol 70 Tampon acétate pH 5 = 20 Eau. 10 N propanol..... 60 Tampon phosphate ph 4,9..... 20 Eau. 20	Réactif au ferricyanure U. V.
(139) VARMA T.N.R. PANALAKS T. MURRAY T.K. 1964	Esters des vitamines A1 et A2 Aldéhyde de la vitamine A1 Aldéhyde de la vitamine A2 Alcool de la vitamine A1 Alcool de la vitamine A2	Alumine G.	Méthanol à 0,25 % dans le cyclohexane Ethanol à 3 % dans le cyclohexane	U. V. Trichlorure de Sb Elution spectre d'absorption

TABLEAU 9

STÉROÏDES

(108) SCHMIDT V. ELMENDORFF H. 1958	Sterols dans les Lipides du Sérum	Gel de Silice G.	Cyclohexane..... 50 Chloroforme 50	Ac. orthophosphorique 120° C. 20 mn. puis Ac. phosphomolybdique 120° C.
(43) GÄNSHIRT H. KOSS F.W. MORIANZ U.K. 1960	Acides biliaires libres et conjugués.	Gel de Silice G.	Toluène..... 50 Ac. acétique. 50 Eau. 10 Butanol..... 100 Ac. acétique. 10 Eau. 10	Ac. orthophosphorique puis Ac. phosphomolybdique
(50) HERMANEK S. SCHWARZ V. CEKAN Z. 1961	Cholestérol Testostérone Progestérone Œstrone Œstradiol Prégnénolone	Alumine G. d'activité III	Ether de pétrole ... 50 Benzène 50 Benzène 95 Éthanol..... 5	
(126) STAHL E. KALTENBACH U. 1961	Acétyldigitoxine Digitoxine, Gitoxine, Digoxine, A, B, C Lanatoside A, B, C Désacétyllanatoside A, B, C K. Strophantoside, Cymarine, Proscillaridine A, Scillarène A.	Gel de Silice G.	Dichlorure de méthylène 80 Méthanol 19 Formamide..... 1	Ac. Trichloroacétique 15 Chloramine 1 110° C. 10 mn. U. V.

TABLEAU 9

STÉROÏDES (suite)

(62) KAUFMANN MAKUS DEICKE 1961	Esters du Cholestérol	Gel de Silice G.	Tétraline..... Hexane <i>1^{re} dimension</i>	25 75	Ac. orthophosphorique 120° C. 20 mn. puis Ac. phosphomolybdique 120° C.
		Gel de Silice G. imprégné de paraffine	Méthyléthylcétone.. Acétonitrile <i>2^e dimension</i>	70 30	
(144) WALDI D. MUNTER F. WOLPERT F. 1962	Evaluation semi-quantitative du prégnandiол secreté pendant le cycle ovarien chez la femme. Permet le diagnostic précoce de la grossesse, dans les 10 à 14 jours suivant la conception.	Gel de Silice G.	Chloroforme Méthanol	90 10	Ac. orthophosphorique puis Ac. phosphomolybdique
(45) GÄNSHIRT H.	Hydrocortisone acétate Hydrocortisone alcool	Gel de Silice G.	Acétate d'éthyle ... Xylène Méthanol-	90 5 5	U. V.
(117) SMITH L. FCELL T. 1962	C ₁₈ Stéroïdes C ₁₉ — C ₂₁ — C ₂₇ —	Gel de Silice + amidon	Hexane Acétate d'éthyle ...	1 1	Ac. phosphomolybdique (10 % dans l'éthanol)

TABLEAU 9

STÉROÏDES (suite)

BENNETT R.D. HEFTMANN E. 1962	Corticostéroïdes	Gel de Silice G.	Chloroforme 188 Méthanol 12 Eau. 1 Acétate d'éthyle ... 90 Chloroforme 10 Eau. 1	Ac. sulfurique 50 % 175° - 200° C.
(7) BENNETT R.D. HEFTMANN E. 1962	Smilagénine Diosgénine Tigogénine	Kieselgühr G. imprégné de vapeur d'eau	Hexane 100 Toluène..... 50 Ethanol..... 5 Eau. 45	Ac. sulfurique 50 % 120° - 140° C.
	Acétates et Trifluoroacétates de Sapogénines à structure stéroïdique	Gel de Silice G.	Chloroforme 9 Toluène..... 1	
(32) DUMAZERT C. GHIGLIONE C. PUGNET T. 1963	Œstriol Hydrocortisone Cortisone Androstanédiol Œstradiol Testostérone Déhydroisoandrosterone Androstérone Œstrone	Gel de Silice G. 95 Alumine G. 5	Benzène 85 Ethanol..... 15	Dinitrophénylhydrazine en solution hydro- alcool-sulfurique

MÉDICAMENTS

ANALGÉSQUES, ANTIPYRÉTIQUES, ANTIRHUMATISMAUX.					
(42) GÄNSHIRT H. 1962	Novalgine Atophan Antipyrine Aspirine	Kieselgel G. + 2 % de phosphore ZS, super	Méthyléthylcétone	U. V.	
ANTIBIOTIQUES.					
(37) FISCHER R. LAUTNER H. 1961	Pénicilline et dérivés	Kieselgel G.	Acétone..... Méthanol	50 80	Azidure de Na 3,5 g Iode 0,1 N 100 ml.
HYPNOTIQUES.					
(142) WALDI D. 1962	Luminal Barbital Allobarbitol Phanodorm Prominal	Kieselgel G. Aluminoxide	Cyclohexane..... Isopropanol Ammoniaque 25 %.	25 65 10	U. V.

TABLEAU 10

MÉDICAMENTS (suite)

EXTRAITS D'ORGANES.				
(145) WALDI D. MUNTER F. WOLPERT E. 1962	Adrénaline et Noradrénaline Extraits de surrénales de chat.	Gel de Silice G.	Chloroforme 90 Méthanol 10	Vanilline + Ac. sulfurique
PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES.				
(72) LIEBICH H. 1959	Tablettes. Ac. acétylsalicylique Codéine Phénacétine	Gel de Silice G.	Méthanol Chloroforme 100 Ethanol..... 1	Nitrate ferrique HNO_3 65 % Draggendorff HNO_3 12,5 % 80-90° C.
(44) GÄNSHIRT H. MALZACHER A. 1960	Suppositoires. Théophrilline Papavérine Luminal	Gel de Silice G.	Benzène 80 Ethanol..... 12 Ac. acétique. 5	U. V.
(18) BRODASKY T.F. 1963	Sulfates de Néomycines A, B, C.	Charbon traité à H_2SO_4	H_2SO_4 0,5 N.	Mesure de l'activité biologique directement sur la plaque.

COLORANTS SYNTHÉTIQUES.

(151) WOLLENWEBER. 1962	Colorants alimentaires	Cellulose	N Propanol 6 Acétate d'éthyle ... 1 Eau. 3
(71) LICHTENBERGER W. 1962	Orange soudan G. Rouge soudan R. Bleu soudan G. Orange soudan RR. Violet soudan BR.	Gel de Silice G.	Benzène
(106) SAENZ LASCANO RUIZ I. LAROCHÉ C. 1963	Jaune AB. Jaune OB. Coccine nouvelle Amaranthe Orangé G. Ponceau 2T Vert malachite Violet de Paris	Alumine G. + Na ₂ CO ₃ Alumine G. Gel de Silice	Benzène 1 CCl ₄ 1 Eau Butanol. 9 Ethanol..... 1 Eau. 1
DÉRIVÉS DE L'INDOL.			
(124) STAHL E. KALDEWEY U.H. 1961	Dérivés de l'indol. Scatol, l. (3)-acétonitrile Ac. l. (3)-butyrique Ac. l. (3)-propionique Ac. l. (3)-acétique Indol (3) acétamide Tryptophane	Gel de Silice G.	Chloroforme 95 Ac. acétique. 5 Formaldéhide 25 % 10 HCl 25 % 10 Éthanol 96 % 20 100° C. 5 mn. puis U. V.

TABLEAU II
DIVERS (suite)

TERPÈNES.				
(50) HERMANEK S. SCHWARZ V. CEKAN Z. 1961	Terpinéol, Ionol, Pseudo-ionone, Citrol, bêta-ionone, alpha-ionone, Ironé, Carvone, Acétate de Géranyle, Camphre, Menthol, Bornéol.	Alumine d'activité III étalée à sec avec une baguette de verre	Ether de pétrole ... 8 Benzène 2 Ether de pétrole ... 1 Benzène 1 Benzène Benzène 98 Ethanol. 2 Benzène 95 Ethanol. 5	Trichlorure d'antimoine
ACIDES DICARBOXYLIQUES.				
(4) BRAUN D. GEENEN H. 1962	Acides oxalique, malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique, subérique, azélaïque, sébacique.	Gel de Silice G.	Ethanol 96 % 100 Eau 12 Ammoniaque 25 % . 16	Vert de bromocrésol
SUBSTANCES HYDROPHILES DES PLANTES.				
(34) EGGER K. 1961	Flavones Glucosides	Polyamide	Eau 65 Ethanol 15 Méthyléthylcétone . 15 Acétylacétone 5	U. V.
(84) MOUTON M. JAQUARD S. SAGOT-MASSON M. 1963	Acide asiatique Extrait de Centella Asiatica, Ombellifères.	Poudre de verre	Acétate d'éthyle	Anh. acétique 1 Ac. sulfurique 9

DIVERS (suite)

PIGMENTS DES ALGUES.			
(48) RAI HAKUMAT LEE FRED G. 1964	Carotène alpha Chlorophylle alpha Lutéine Chlorophylle bêta Néoxanthine Violaxanthine	Cellulose + sucre + amidon	N Propanol à 5 % dans l'éther de pétrole.
NITRATES.			
(31) DICARLO F.J. HARTIGNAN J.M. PHILLIPS G.E. 1964	Pentaérythrite — mononitrate — dinitrate — trinitrate — tétranitrate	Gel de Silice G.	Toluène..... 1 Acétate d'éthyle ... 1 Acétate d'éthyle saturé d'eau. Diphénylamine à 1 % dans l'éthanol absolu <i>Composés nitrés</i> Métaperiodate de Na à 2 % KMnO_4 1 % Na_2CO_3 2 % Pentaérythrite
HYDROCARBURES AROMATIQUES.			
(107) SAWICKI E. STANLEY W.T. ELBERT W.C. PFAFF J.D. 1964	Hydrocarbures aromatiques à plusieurs noyaux, polluants atmosphériques.	Alumine Cellulose acétylée Cellulose	Pentane 19 Ether éthylique. ... 1 Ethanol 17 Toluène..... 4 Eau. 4 Diméthylformamide. 1 Eau. 1 U. V.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

*L*ES travaux personnels, que nous exposons dans cette deuxième partie, sont consacrés à la mise au point de modalités techniques nouvelles de la chromatographie sur couches minces et à leurs applications analytiques. Ils concernent l'utilisation :

- de couches minces de résines échangeuses d'ions,
- de couches multiples successives, de nature différente et juxtaposées sur la même plaque de verre,
- de couches ultra-minces de résines échangeuses d'ions, fixées, non plus sur des plaques de verre, mais sur un support souple, en polyester, inaltérable et transparent (feuilles chromatographiques Kodak).

CHAPITRE PREMIER

COUCHES MINCES DE RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS

ON a fondé quelque espoir ces dernières années, sur l'utilisation en chromatographie, de papiers échangeurs d'ions à base de celluloses modifiées et de papiers imprégnés de résines synthétiques.

Cependant, aucune comparaison systématique ne semble possible avec les résultats obtenus classiquement sur des colonnes d'échangeurs, de type Amberlite, Dowex ou Séphadex et le passage de l'échelle micro-analytique à l'échelle préparative, ou inversement, se heurte encore à de nombreuses difficultés.

C'est pourquoi, grâce aux qualités physiques et chimiques des résines analytiques actuelles et en particulier leur grande finesse, nous avons pensé obtenir à l'échelle micro-analytique, sur couches minces de résines échangeuses d'ions, des séparations d'ions minéraux ou de molécules organiques, superposables à celles effectuées couramment sur colonnes des mêmes échangeurs.

La multiplicité et la rapidité des essais, réalisables sur couches minces, offraient également avec les résines, comme avec les autres supports classiques, un avantage incomparable pour la mise au point des techniques de séparations éventuellement transposables ensuite sur colonne préparative.

Nos premiers essais (8) ont été pleinement satisfaisants et ont justifié des recherches complémentaires (9, 10, 11, 12), dont nous exposons ici l'ensemble de façon détaillée.

I. — PREPARATION DES COUCHES MINCES DE RESINES ECHANGEUSES D'IONS

Nous avons tout d'abord tenté de réaliser des couches minces en utilisant une simple suspension de résine dans l'eau distillée. Les couches ainsi obtenues, parfaitement lisses et homogènes à l'état humide, devenaient rapidement inutilisables après dessiccation, par craquellement de toute la surface.

Des couches minces obtenues en ajoutant 5 % de plâtre à la suspension aqueuse de résine nous ont permis de réaliser nos premiers essais. Mais là encore, l'homogénéité et l'adhérence de la couche à la plaque de verre n'étaient pas parfaites.

Nous avons remédié à ces inconvénients en ajoutant à la résine une certaine proportion de poudre de cellulose, exempte de plâtre. Nous avons obtenu ainsi des couches minces très résistantes et qui restent parfaitement homogènes à la dessiccation.

Après avoir utilisé, au début (8), de la cellulose avec plâtre MN. 300 G. en quantité égale à la quantité de résine, nous avons finalement retenu comme composition de la masse à étaler la formule suivante :

Cellulose MN. 300 (sans plâtre)	5 g.
Résine analytique essorée sur verre fritté	30 g.
Eau distillée	60 ml.

Les proportions indiquées conviennent pour la préparation de cinq plaques carrées (200 × 200 mm.) ou de 20 plaques rectangulaires (50 × 200 mm.).

Cette faible proportion de cellulose diminue, au cours de la chromatographie, les risques de superposition de phénomènes de partage au phénomène initial de l'échange d'ions. La présence de cellulose influe pratiquement très peu sur la séparation des ions minéraux, ou des molécules de petite dimension, mais il peut en être tout autrement avec des molécules organiques volumineuses.

Les résines employées sont de qualité analytique et correspondent à une maille de 200 à 400 mesh.

Nous avons rassemblé dans un tableau, avec leurs principales caractéristiques, les différents types de résines, utilisées au cours de nos expériences.

La forme ionique de la résine, c'est-à-dire la nature de l'ion fixé sur les groupements échangeurs, joue un rôle très important au cours de la chromatographie. Pour cette raison, on est amené sou-

PROPRIÉTÉS DES RÉSINES (*)

Résine.	Biorad AG. 50 ou 50 W. Dowex 50 ou 50 W. Echangeur de cations Fortement acide	Biorad AG. 1 Dowex 1 Echangeur d'anions Fortement basique	Biorad AG. 3 Dowex 3 Echangeurs d'anions Faiblement basique	Biorad Chelex 100 Dowex A 1 Résine cationique Complexante faiblement acide	Biorad Bio-Rex 5 Duclite A — 30 Echangeur d'anions Basilité moyenne	Amberlite CG120 Echangeurs de cations Fortement acide
Type.....						
Groupement actif	$\emptyset - \text{SO}_3$	$\emptyset - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Polyamine	$\emptyset - \text{N} \left\{ \begin{array}{l} \text{CH}_2\text{COO}^- \\ \text{CH}_2\text{COO}^- \end{array} \right.$	$\text{R}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) $\text{R}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$	SO_3H
Forme ionique	$\text{H}^+ (\text{NH}_4^+)$	$\text{Cl}^- (\text{OH}^-, \text{SO}_4^{2-})$	Cl^-	$\text{Na}^+ (\text{Ba}^{++}, \text{H}^+)$	Cl^-	$\text{Na}^+ (\text{H}^+)$
Ordre décroissant de sélectivité des ions : — monovalents	$\text{Ag}-\text{Rb}-\text{Cs}-\text{K}-\text{NH}_4$ $\text{Na}-\text{H}-\text{Li}$	$\text{I}-\text{NO}_3-\text{Br}-\text{Cl}-$ $\text{HCO}_3^--\text{IO}_3^-$ $\text{H}_2\text{COO}-\text{Ac}-\text{OH}-$ F^-	(2) $\emptyset - \text{SO}_3\text{H}-$ $\text{HClit}-\text{CrO}_3^-$ H_2SO_4 -tartrique- oxalique- H_3PO_4^- H_3AsO_4^- - HNO_3^- $\text{HI}-\text{HBr}-\text{HCl}-\text{HF}-$ $\text{HCOO}-\text{HAc}-$ H_2CO_3	$\text{H}-\text{Li}-\text{Na}-\text{K}$		
— divalents	$\text{Zn}-\text{Cu}-\text{Ni}-\text{Co}-$ $\text{Ba}-\text{Sr}-\text{Ca}-$			$\text{Cu}-\text{Pb}-\text{Fe}^{+++},$ $\text{Al}^{+++}-\text{Cr}^{+++}-\text{Ni}-$ $\text{Zn}-\text{Ag}^+-\text{Co}-\text{Cd}-$ $\text{Fe}-\text{Mn}-\text{Ca}-\text{Sr}-\text{Ba}-$		

(*) D'après Bio-Rad, Laboratoires, Richmond, Californie U.S.A.

vent à remplacer les ions habituellement fixés sur les résines commerciales (H^+ , Na^+ , Cl^-) par d'autres ions plus ou moins échangeables, tels que OH^- , CH_3COO^- , Li^+ , NH_4^+ , Ba^{++} , etc... Nous avons indiqué dans le tableau la forme ionique commerciale des résines et, entre parenthèses, celles que nous avons eu l'occasion d'utiliser.

La préparation de la résine sous la forme désirée se fait par simple contact de celle-ci avec un gros excès de réactif échangeur, sous agitation constante. Généralement, trois contacts successifs sont suffisants, soit un premier contact d'environ quinze heures suivi de deux contacts de deux à trois heures chacun. Il faut noter toutefois que la transformation de la résine Chelex 100 nécessite un temps de contact beaucoup plus long qui n'est jamais inférieur à 72 heures. On termine la préparation par de nombreux lavages à l'eau distillée avec contrôle des eaux de lavage, et finalement par un essorage sur verre fritté.

L'appareillage utilisé pour la confection des couches minces est celui de Stahl, construit par Desaga (Heidelberg) et le mode d'étalement a déjà été décrit dans la première partie. Seule, la technique de préparation de la masse à étaler est légèrement différente de la technique classique et nécessite quelques précisions supplémentaires. Dans un mortier d'assez grande capacité, on introduit la poudre de cellulose et quelques millilitres d'eau distillée, afin d'obtenir une masse granuleuse, s'effritant facilement, que l'on triture énergiquement pendant quelques minutes. Cette trituration indispensable, a pour but de diviser parfaitement la poudre de cellulose, ce qui permet d'obtenir, ensuite, des couches très régulières. On ajoute alors 20 à 30 millilitres d'eau distillée, par petites portions, en poursuivant la trituration, jusqu'à obtenir un mélange relativement fluide, dans lequel on ajoute la totalité de la résine, puis progressivement, le reste de l'eau distillée. La masse à étaler, parfaitement homogène, est alors prête à être versée dans l'étaleur spécial, placé sur la première plaque de verre. Après l'étalement, réalisé selon la technique habituelle, les plaques sont séchées à l'air libre, puis stockées dans une armoire étanche qui les protège des poussières, des vapeurs du laboratoire et de la dessiccation. Il faut noter, que les couches minces de résines échangeuses d'ions doivent, de préférence, être utilisées dans un délai ne dépassant pas les huit jours qui suivent leur préparation, car le vieillissement des couches se traduit par une altération marquée de leur pouvoir séparateur.

II. - SEPARATIONS REALISEES SUR COUCHES MINCES DE RESINES ECHANGEUSES D'ANIONS

1°) HALOGENES.

Le point de départ de nos recherches a été l'excellente méthode de séparation sur colonne d'un mélange des trois halogènes, chlore, brome et iode, sous forme d'halogénures, proposée par de Geiso et collaborateurs (28). Le mélange est déposé au sommet d'une colonne de résine anionique, de type Dowex 1 X 10 (100 à 200 mesh) et préparée sous forme NO_3^- . Le passage successif du même éluant, mais à deux concentrations différentes, permet d'entraîner les chlorures dans un premier temps à l'aide d'une solution aqueuse de NaNO_3 0,5 M. et dans un deuxième temps, d'éluer séparément les bromures puis les iodures à l'aide de NaNO_3 2M. Les quantités absolues respectives des trois halogènes, présents dans le mélange, rendent possible la mise en œuvre, sur les fractions obtenues, de méthodes de dosage chimique classiques.

Les seules modifications que nous avons dû apporter à cette technique, en vue de son adaptation aux couches minces, concernent la granulométrie de la résine (200 à 400 mesh), l'utilisation d'halogènes radio-actifs, pour faciliter la détection de micro quantités et l'emploi d'un seul type de solvant. Nous avons essayé le même solvant à différentes concentrations (NaNO_3 0,25 M. - 0,5 M. - M. 2M) et nous avons constaté que seule une solution molaire de NaNO_3 donnait une séparation correcte des trois halogènes.

Nous avons pu fractionner ainsi, en chromatographie ascendante, un mélange de $^{36}\text{Cl}^-$, $^{82}\text{Br}^-$ et $^{131}\text{I}^-$, sur une couche mince de Dowex 1 X 10, préparée sous forme OH^- (non radio-actif). La position des différents spots est déterminée, dans un premier temps, avec un scintillateur à NaI (Tl) (fig. 1, courbe 2). Les mesures sont renouvelées, dans un second temps, par spectrométrie gamma, sur les pics photo-électriques de 780 keV pour $^{82}\text{Br}^-$, et 364 keV pour $^{131}\text{I}^-$, et permettent ainsi de localiser ces éléments. La position de $^{36}\text{Cl}^-$, émetteur bêta pur, est déduite par différence. Faiblement retenu par la résine, le chlore est entraîné le premier, suivi de près par le brome, tandis que l'iode, fortement retenu, migre très peu. Il semble que le mécanisme de cette séparation puisse être relié,

d'une part à l'affinité propre des ions pour la résine et d'autre part aux rayons des ions, qui sont respectivement de 1,81 Å pour Cl^- , 1,95 Å pour Br^- et de 2,16 Å pour I^- . Les périodes très différentes de ^{82}Br (36 h.), de ^{131}I (8 jours) et de ^{36}Cl ($3,1 \cdot 10^5$ ans) ont permis, en renouvelant les mesures à huit jours d'intervalle, de confirmer l'ordre de leur séparation (fig. 1, courbe 3).

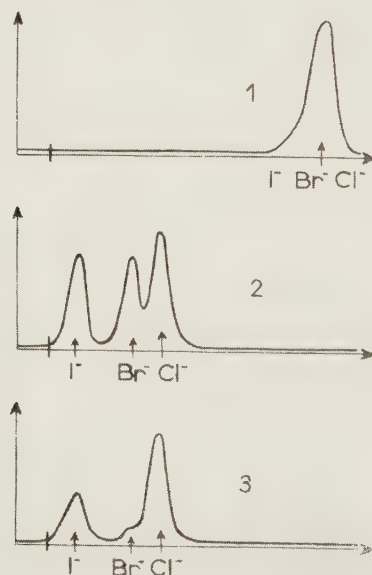


FIGURE 1

Une chromatographie du même mélange, effectuée dans les mêmes conditions, avec le même solvant, mais sur une couche mince de cellulose pure (N.N. 300), s'est avérée incapable de séparer ces trois halogènes (fig. 1, courbe 1). Ceci prouve donc que, dans les couches minces de résines contenant 1/6^e de poudre de cellulose, la résine échangeuse d'ions joue le rôle essentiel dans la séparation chromatographique.

La figure 2 montre l'autoradiographie d'un chromatogramme du même mélange, ainsi que des témoins correspondants, constitués par les solutions pures des halogènes radio-actifs.

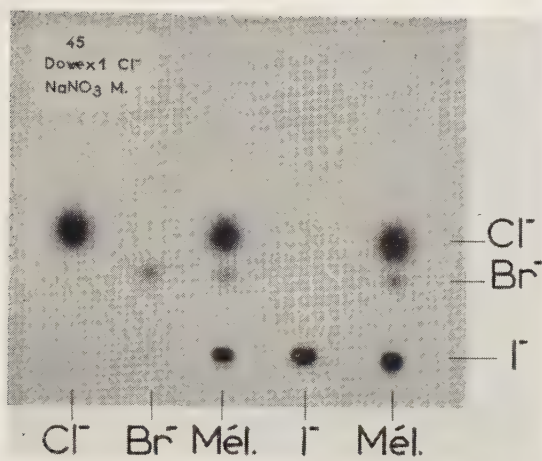


FIGURE 2

2°) MOLÉCULES ORGANIQUES HALOGÉNÉES.

(Tétrachlorofluorescéine et dérivés).

Nous avons été amenée à effectuer le contrôle analytique de produits de synthèse radio-actifs, destinés à l'usage médical : la tétraïodo-tétrachlorofluorescéine (rose Bengale) marquée par ¹³¹I et la tétrabromo-tétrachlorofluorescéine (phloxine) marquée par ⁸²Br.

Nous avons essayé tout d'abord de séparer ces deux colorants radio-actifs et la tétrachlorofluorescéine (T.C.F.), matière première de départ de la synthèse de ces deux produits. Sur couche mince de résine Dowex 1 X 2, préparée sous forme OH⁻, nous avons constaté que les solvants non polaires, tels que benzène et éther de pétrole, n'amorçaient aucune séparation, pas plus d'ailleurs que les alcools de bas poids moléculaire, ou le chloroforme, pris séparément.

Après quelques essais préliminaires à l'aide de solvants ternaires, tels que des mélanges Butanol-acide acétique-eau et méthanol-acide acétique-eau, et devant les résultats peu satisfaisants obtenus, nous avons remplacé l'eau par une certaine proportion d'acétone ou de butanone.

De très bonnes séparations ont été ainsi obtenues avec le mélange méthanol-acide acétique et acétone (20-20-5) (8) et fina-

lement nous nous sommes arrêtés au solvant d'élution suivant : acide acétique-méthanol-acétone-butanone (35-20-15-5) qui semble effectivement donner les meilleurs résultats (10). En chromatographie ascendante, on isole ainsi, par ordre de mobilités décroissantes, la T.C.F. non radio-active, puis la phloxine (P) et le rose Bengale (R), dont la radio-activité, mesurée avec un scintillateur à NaI (TI), est représentée sur la courbe 1 de la figure 3, au-dessus des spots colorés correspondants du chromatogramme. A ce sujet, il faut noter, que tous les solvants acétiques décolorent la T.C.F., la floxine et le rose Bengale ; aussi, pour révéler les taches de ces colorants, après chromatographie, il convient de laisser d'abord sécher la plaque à l'air libre, puis de vaporiser cette dernière avec une solution de soude 0,1 N., ou de l'exposer tout simplement aux vapeurs d'ammoniaque.

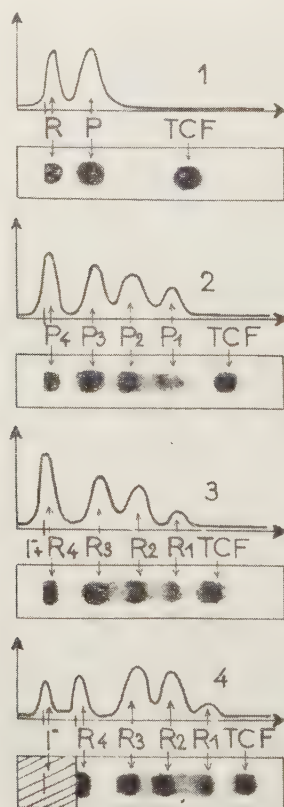


FIGURE 3

Les mécanismes qui interviennent au sein de la couche mince de résine, au cours de la séparation de ces colorants, sont certainement plus complexes que les phénomènes d'échanges d'ions, qui prédominent au cours de la séparation des halogènes. Cependant les effets d'adsorption (attraction polaire et de Van der Waals) et les effets de tamis (diffusion à travers les mailles de la résine) conduisent, malgré des conditions opératoires quelque peu différentes, à une séparation des molécules organiques iodées, bromées ou chlorées, dans un ordre identique à celui que l'on observe pour les halogènes correspondants.

Cette technique nous a permis également de contrôler la synthèse de la phloxine et du rose Bengale radio-actifs et de définir rapidement l'excès de réactif halogénant à utiliser, pour obtenir des produits de pureté satisfaisante, avec le meilleur rendement. En effet, des mélanges de dérivés, résultant d'une halogénéation partielle, ont pu être résolus, en chromatographie descendante, et sur des couches minces identiques, en utilisant le dernier éluant, soit : acide acétique-méthanol-acétone-butanone (35-20-15-5). Les courbes 2 et 3 de la figure 3 représentent respectivement la radio-activité des composés moins halogénés (P_1 , P_2 , P_3) que la phloxine (P_1) et celle de dérivés iodés (R_1 , R_2 , R_3) moins halogénés que le rose Bengale (R_1). Sur les chromatogrammes correspondants, schématisés en dessous de chaque courbe, on distingue, en outre, le spot de la T.C.F. en excès, non transformée, qui est toujours moins adsorbée par la résine, que tous les autres dérivés, même partiellement bromés ou iodés.

3°) PHOSPHATES.

Nous avons entrepris également l'étude analytique des dérivés oxygénés minéraux du phosphore et en particulier d'un mélange d'orthophosphate, de pyrophosphate, de tripolyphosphate et d'hypophosphite de sodium. Sur résine Bio-Rex 5 (Cl) et en chromatographie ascendante, plusieurs essais ont été effectués à l'aide de solutions aqueuses de NaCl et de NaNO_3 à différentes concentrations. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec NaNO_3 M., qui sépare par ordre de mobilité croissante : tripolyphosphate, pyrophosphate, orthophosphate et hypophosphite. Le comportement chromatographique de ces composés est fondé à la fois sur les différences de masse ou de volume moléculaire et sur le nombre variable de grou-

pements anioniques. La résine échangeuse d'anions retient donc plus énergiquement le tripolyphosphate, dont le poids et le volume moléculaires sont les plus élevés et les fonctions anioniques les plus nombreuses. Le pyrophosphate vient ensuite, puis l'orthophosphate et l'hypophosphite.

La révélation des spots s'effectue après séchage des plaques, par pulvérisation d'une solution aqueuse à 10 % de molybdate d'ammonium en milieu sulfurique, puis d'une solution à 10 % de chlorure stanneux dans l'acide chlorhydrique à 10 %. Il apparaît immédiatement des taches bleues sur le fond beige de la résine. La coloration due à l'hypophosphite est fugace et disparaît complètement dans un délai assez court après la vaporisation.

La figure 4 représente une chromatographie du mélange précédent et des témoins correspondants, obtenue sur résine Bio-Rex 5 (Cl^-) avec NaNO_3 M. comme éluant, et photographiée immédiatement après la révélation.

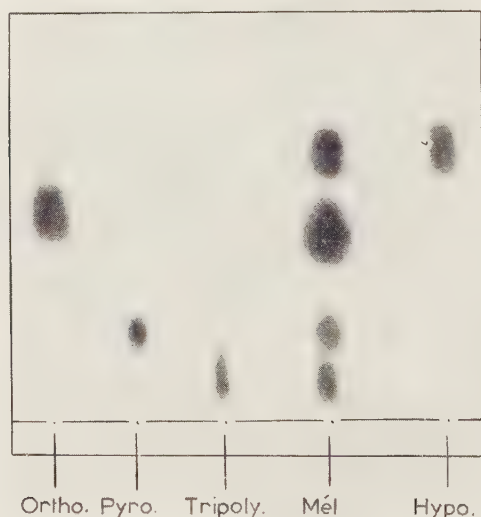


FIGURE 4

Parallèlement aux essais précédents, nous avons utilisé également la résine AG. 3 X 4 (Cl^-), mais si les composés étaient bien séparés dans un ordre identique, leur différenciation restait nettement moins bonne que sur Bio-Rex 5.

4°) NUCLÉOTIDES.

Eléments constitutifs des acides nucléiques, les nucléotides possèdent déjà un poids moléculaire relativement élevé. Ils sont composés d'une base purique ou pyrimidique et d'un sucre estérifié par l'acide phosphorique ou polyphosphorique. Il s'agit là de composés très difficiles à distinguer chimiquement les uns des autres et pourtant leur fractionnement analytique est un problème biochimique majeur et d'actualité. Pour isoler à l'état pur de grandes quantités de ces composés, les colonnes d'échangeurs d'ions sont supérieures (20) (21) à toutes les autres méthodes. Nous avons donc essayé de trouver, sur couches minces de résines échangeuses d'ions, une méthode de séparation qui puisse ensuite être transposée sur colonne de la même résine. Nous avons travaillé sur un mélange d'adénosine monophosphate (A.M.P.), adénosine diphosphate (A.D.P.) et adénosine triphosphate (A.T.P.).

Nous référant aux solvants utilisés précédemment pour la séparation des phosphates, nous avons, dès le premier essai, obtenu une très bonne séparation de ces trois composés. La figure 5 représente une chromatographie ascendante d'un mélange d'A.M.P., A.D.P. et A.T.P. et des témoins correspondants, réalisée sur résine Bio-Rex 5 (Cl^-) à l'aide d'une solution aqueuse de NaCl M.

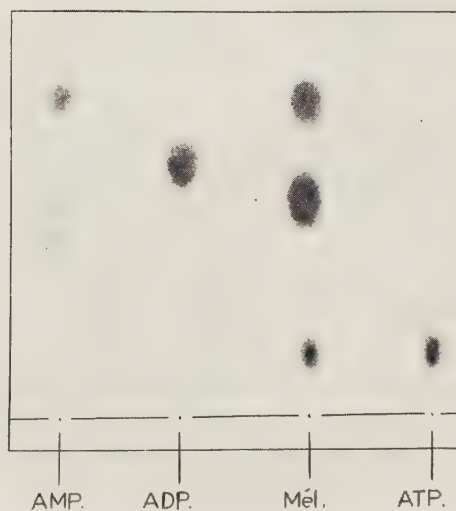


FIGURE 5

Comme on peut le voir sur cette figure, la migration de ces substances dépend plus de leurs différences de charge négative (mono, di et triphosphates) que des écarts relativement faibles des masses ou volumes moléculaires : l'A.M.P. moins riche en groupements ionisés est le moins retenu et migre plus rapidement que l'A.D.P. et celui-ci plus rapidement que l'A.T.P.

La technique de révélation est identique à celle utilisée pour les phosphates minéraux et engendre là encore, des taches bleues qui se différencient parfaitement sur le fond beige.

III. SEPARATIONS EFFECTUEES SUR COUCHES MINCES DE RESINES ECHANGEUSES DE CATIONS

1°) ALCALINS.

Nous avons relevé dans la littérature deux publications relatives à la séparation des cations alcalins, sur colonne de résine cationique. W.E. Cohn et H.W Kohn (19) ont réalisé la chromatographie des isotopes radio-actifs suivants : ^{24}Na , ^{42}K , ^{86}Rb et ^{134}Cs sur colonne de résine Dowex 50, à l'aide d'HCl 0,15 N., puis d'HCl 0,3 N. Ils isolent successivement le sodium, le bloc potassium et rubidium et enfin le césium, sans séparer de façon parfaite rubidium et potassium. Par contre, Kayas (65) obtient une séparation complète de ces quatre isotopes, en remplaçant la résine Dowex 50 par l'Amberlite IR. 100 et en utilisant successivement comme éluants : HCl 0,1 N. et HCl N.

Nos premiers essais de chromatographie sur couches minces correspondent à la transposition de la technique de W.E. Cohn. Nous sommes partis d'un mélange constitué par les cations des isotopes suivants : ^{24}Na (15 h.), ^{42}K (12,5 h.), ^{86}Rb (18,5 jours), tous émetteurs bêta et gamma et identiques aux isotopes utilisés par les auteurs précédents ; pour le césium, nous avons préféré nous adresser, pour cette expérience, à ^{131}Cs (9,9 jours) plutôt qu'à ^{134}Cs (2,2 ans) en raison de la période physique de ce dernier. L'utilisation de ^{131}Cs présente cependant quelques inconvénients sur le plan technique, car, préparé à partir de ^{130}Ba par irradiation aux neutrons, il contient des quantités importantes de ^{131}Ba (12 jours), ce qui nous a conduits à modifier quelque peu les modalités opératoires. Un certain nombre d'essais préliminaires, effectués en

chromatographie ascendante sur couches minces de résine Dowex 50.W.X.2 (H^+) et avec des solutions aqueuses de titre variable en HCl, nous ont conduits à adopter dans un premier temps un solvant constitué par HCl N., qui sépare, par affinité décroissante pour la résine, le bloc baryum et césium, le bloc rubidium et potassium et enfin le sodium, qui migre le plus rapidement. Connaissant la présence de ^{131}Ba , confirmée d'ailleurs par une autre technique (alcalino-terreux), nous avons cherché un solvant permettant la séparation du baryum et du césium, tout en respectant la séparation partielle des autres éléments. Les meilleurs résultats ont été obtenus à l'aide d'une solution aqueuse molaire de LiCl et sont rapportés dans la figure 6.

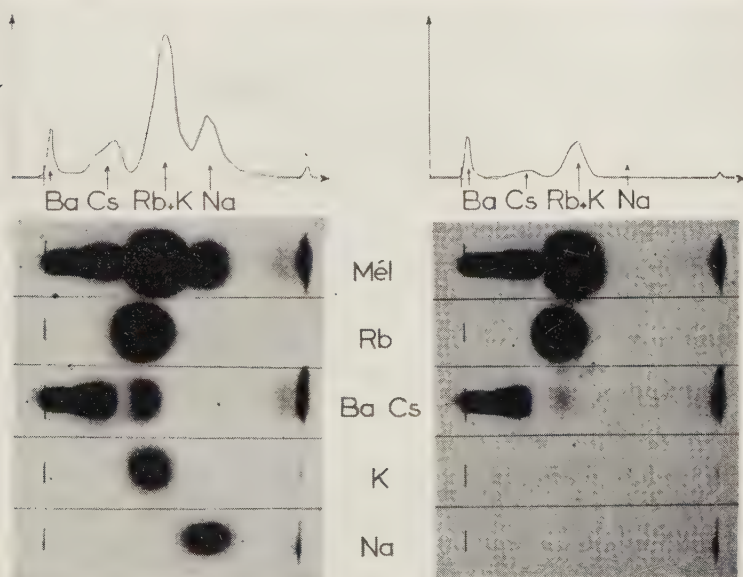


FIGURE 6

A la partie supérieure, ont été tracées les courbes obtenues à un mois d'intervalle, à l'aide d'un compteur G.M. ; elles représentent la radio-activité des différents spots, correspondant aux éléments séparés. A la partie inférieure de la même figure, des autoradiographies des chromatogrammes du mélange et des témoins permettent d'identifier, de manière satisfaisante, les différents éléments. Les documents rapportés sur la partie droite de la figure et obtenus

un mois après, montrent la disparition de radio-activité due à ^{21}Na et à ^{42}K , une diminution marquée des pics correspondant à ^{131}Cs et au bloc ^{42}K et ^{86}Rb . On constate par ailleurs, l'extrême hétérogénéité du mélange de césium et de baryum, qui mériterait à lui seul une étude plus poussée.

Dans un travail plus récent (11), nous avons essayé d'obtenir une séparation des mêmes cations alcalins, mais en utilisant une nouvelle sorte de résine, la chelex 100, résine cationique complexante à groupements aminodiacétates. Nous référant aux résultats obtenus précédemment avec la résine sulfonate Dowex 50, nous avons tout d'abord utilisé le même solvant, à la même concentration, c'est-à-dire LiCl M. Mais le pouvoir de rétention de cette résine est beaucoup plus faible que celui de la Dowex 50 vis-à-vis des cations alcalins, car elle ne conduit pas à la formation de complexes stables avec ces derniers. C'est pourquoi, le solvant employé s'est avéré avoir un pouvoir éluant trop élevé et n'a pas permis de résoudre le mélange des mêmes isotopes radio-actifs que précédemment, dans lequel seul ^{131}Cs est remplacé par ^{134}Cs , dont la pureté est bien supérieure. Sur résine Chelex 100 (Na^+), LiCl M. entraîne tous les cations avec le front du solvant. Néanmoins, nous avons réussi à les séparer en deux groupes distincts, à l'aide d'une solution aqueuse de LiCl 0,25 M. Le premier groupe, comprenant le potassium et le sodium, migre avec le front du solvant, alors que le second, composé du rubidium et du césium, est plus fortement retenu par la résine et possède un Rf d'environ 0,5 (fig. 7).

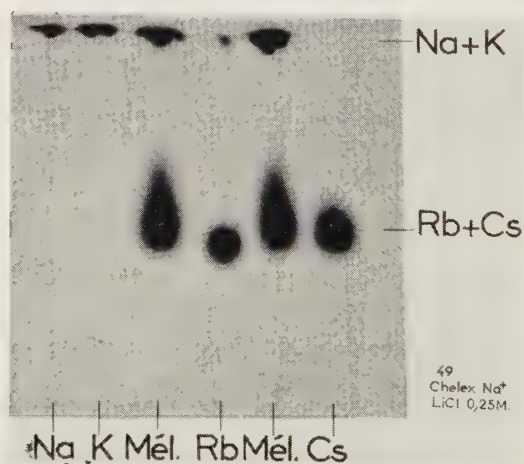


FIGURE 7

2°) ALCALINO-TERREUX.

Une séparation des cations alcalino-terreux radio-actifs sur colonne de résine cationique a été réalisée en 1947 par Tompkins et collaborateurs (134) et plus récemment H. Lerner et W. Rieman (70) ont publié une excellente méthode, appliquée à un mélange de calcium, de strontium et de baryum. Ils utilisent une colonne de résine Dowex 50 et un éluant constitué par une solution aqueuse de lactate d'ammonium 1,2 M., qui leur permet d'obtenir trois fractions, correspondant respectivement à Ca^{++} , Sr^{++} et Ba^{++} , qu'ils do-ent ensuite par des méthodes chimiques. Comme pour les halogènes et les alcalins, la rétention des cations alcalino-terreux, par une résine échangeuse forte, semble proportionnelle à la dimension des ions, ceci n'étant valable évidemment que pour des ions de charge identique.

Nous avons pu transposer assez facilement la technique de Lerner sur couches minces de résine Dowex 50 W.X.2 (H^+). Nous avons tout d'abord travaillé en chromatographie ascendante sur le mélange des trois alcalino-terreux non radio-actifs. Parmi les différentes concentrations essayées, la solution aqueuse molaire de lactate d'ammonium a donné une excellente séparation des trois cations précédents.

Les spots de chaque élément sont repérés, grâce à une révélation chimique spécifique : sur les plaques séchées à l'air, on pulvérise une solution aqueuse à 0,1 % de rhodizonate de sodium, qui colore le strontium en orangé et le baryum en rouge ; pour révéler le calcium, on pulvérise successivement une solution aqueuse d'ammoniaque à 10 %, puis une solution aqueuse de pourpre de phthaléine à 0,1 % (additionnée de deux gouttes d'ammoniaque, puis d'alcool à 95° jusqu'à décoloration de la solution) : on obtient une coloration violet fugace à l'emplacement du calcium. Pendant cette opération il est préférable de masquer les taches, déjà révélées, du baryum et du strontium.

Nous avons également effectué des essais sur des mélanges d'isotopes radio-actifs : ^{45}Ca (165 jours), ^{89}Sr (51 jours) et ^{131}Ba (12 jours), ce dernier contenant des quantités variables de ^{131}Cs , qui est son produit de transformation. Nous avons conservé le même éluant, mais nous avons fait des essais avec des concentrations différentes et finalement nous avons retenu une solution aqueuse de lactate d'ammonium 0,75 M. qui donnait les meilleurs résultats. En utili-

sant la même technique que précédemment, on sépare par ordre de mobilités croissantes le baryum, le strontium et le calcium, alors que le césium monovalent, donc moins retenu par la résine que les cations alcalino-terreux, est entraîné avec le front du solvant (fig. 8).

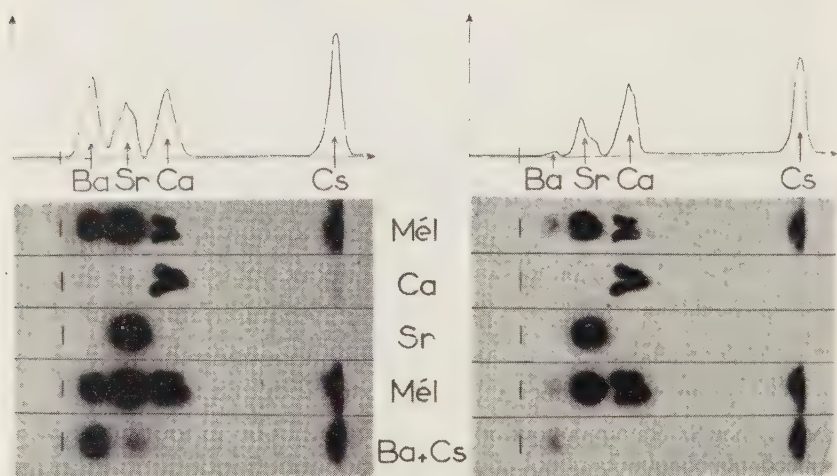


FIGURE 8

Les courbes situées à la partie supérieure de la figure 8 représentent les pics de radio-activité de chacun des éléments séparés, mesurés au compteur G.M., comme pour les alcalins. L'identité des différents éléments a pu être confirmée en évaluant l'énergie du rayonnement correspondant, par interposition d'écrans absorbants étalonnés, entre le compteur et la plaque. De plus, l'autoradiographie comparée des chromatogrammes du mélange et des témoins, ainsi que l'étude de la décroissance de la radio-activité un mois après (partie droite de la figure 8), nous ont apporté une confirmation supplémentaire, grâce aux périodes différentes des éléments étudiés.

D'autre part, nous avons effectué la séparation du même mélange des cations alcalino-terreux radio-actifs, mais sur résine Amberlite C.G. 120 (H^+). En utilisant la même technique, et avec le même éluant (solution aqueuse de lactate d'ammonium 0,75 M.) ; les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus sur résine Dowex 50.

Comme pour les alcalins, nous avons effectué récemment (11) des essais de séparation des cations alcalino-terreux sur couches minces de résine aminodiacétate Chelex 100 (Na^+) et, contrairement à celle des alcalins, la séparation des alcalino-terreux a pu être réalisée de façon satisfaisante. Ces cations bivalents sont très fortement retenus par la résine, car ils forment avec elle des complexes assez stables. Il nous a donc fallu employer ici une solution saline beaucoup plus concentrée que celle utilisée avec la résine Dowex 50. C'est une solution aqueuse de nitrate d'ammonium 2M. qui a donné les meilleurs résultats. La figure 9 représente l'autoradiographie d'un chromatogramme, qui objective la résolution d'un mélange des trois cations alcalino-terreux radio-actifs, avec les témoins correspondants.

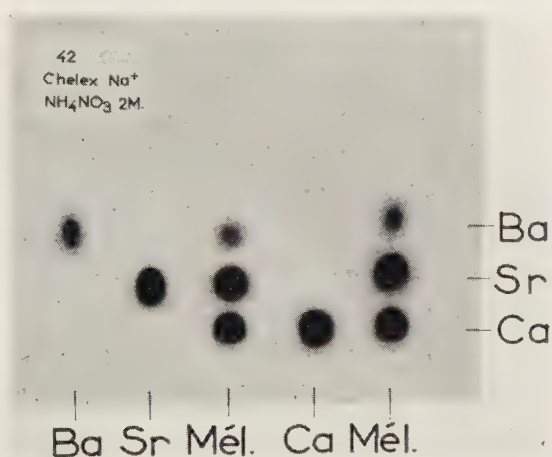


FIGURE 9

On voit que ces éléments sont séparés dans un ordre inverse de celui obtenu sur Dowex 50 (type sulfonate). Il convient de souligner à ce propos, que le milieu étant sensiblement neutre, l'affinité de la résine pour chacun de ces cations est proportionnelle aux constantes de dissociation de leurs complexes respectifs avec l'acide éthylène-diamine-tétraacétique, à savoir :

Ca^{++} : $\text{pKc} = 10,70$; Sr^{++} : 8,63 ; Ba^{++} : 7,76.

La courbe située à la partie supérieure de la figure 10, obtenue au compteur G.M., exprime la radio-activité des spots correspondant aux éléments séparés, que l'on distingue sur l'autoradiographie située à la partie inférieure.

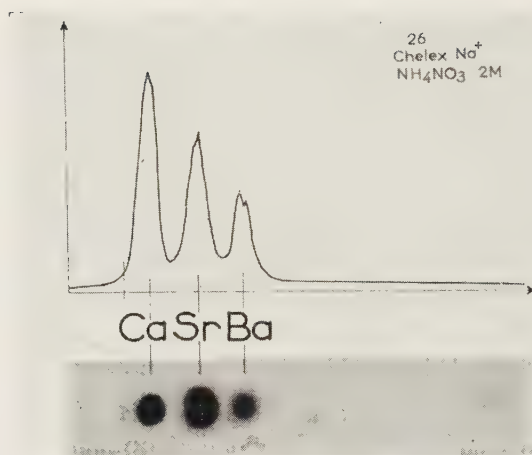


FIGURE 10

3°) MÉTAUX LOURDS.

Nous avons décrit récemment (11) nos premiers essais de séparation sur divers mélanges de cations lourds, par chromatographie monodimensionnelle ascendante, sur couches minces de résine aminodiacétate Chelex 100 (Na^+) et à l'aide de solvants aqueux variés. Nous n'avions obtenu alors que des résultats fragmentaires, se rapportant à des mélanges de Hg^{++} , Cd^{++} , Pb^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et Co^{++} et en utilisant des solutions aqueuses d'HCl de concentrations variables, pures ou additionnées de ZnCl_2 et de butanol, ou d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (E.D.T.A.). C'est ainsi que nous avons pu réaliser une séparation acceptable du mélange de Hg^{++} , Cd^{++} , Pb^{++} et Cu^{++} , à l'aide d'une solution aqueuse de HCl 3N. (fig. 11).

Nous avons poursuivi nos essais, à l'aide de solvants variés, constitués par des solutions aqueuses à différentes concentrations de ZnCl_2 , MnCl_2 , HNO_3 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, E.D.T.A., en travaillant sur des mélanges plus complexes, composés de Sn^{++} , Sb^{+++} , Fe^{+++} , Cr^{+++} , Zn^{++} et Mn^{++} . Nos premiers résultats n'ont pas été satisfaisants d'emblée ; en effet, si chaque changement de solvant faisait effectivement varier la position respective d'un ou deux éléments par rapport aux autres, il ne conduisait jamais à des séparations complètes de tous les composants.

D'autres essais ont été effectués avec la résine Chelex sous forme Ba^{++} , qui est fortement complexée, contrairement à Na^{++} ,

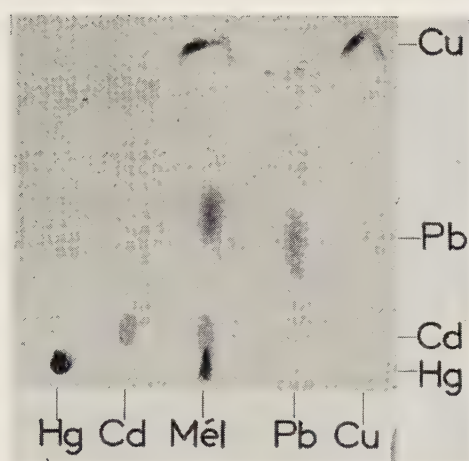


FIGURE 11

mais aucun résultat concluant n'a été obtenu avec HNO_3 2M., HCl 3M. et BaCl_2 M., comme éluants.

Nous nous sommes adressés à la forme H^+ , le complexe résine-proton étant l'un des plus stables de tous et la séparation des cations, appartenant aux différents groupes classiques, a pu être réalisée correctement. Nous décrirons ces expériences en détail :

a) Groupes de l'hydrogène sulfuré.

Premier groupe : Pb^{++} , Ag^+ , Hg^+ .

Contrairement aux séparations satisfaisantes qu'elles ont permis de réaliser sur résine Chelex 100 dans le cas de mélanges d'autres cations, les solutions aqueuses de HNO_3 à différentes concentrations, n'ont pu résoudre simplement le mélange de Pb^{++} , Ag^+ et Hg^+ ; seul le plomb était entraîné plus ou moins loin alors que l'argent et le mercure restaient au point de départ. Par ailleurs, des solutions aqueuses d'ammoniaque ou du mélange $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ à concentrations variables, susceptibles de complexer plus ou moins fortement argent et mercure, n'ont pu séparer ces deux éléments.

Nous avons résolu le problème en utilisant plusieurs solvants successivement, selon la technique dite « des développements répétés ». La figure 12 montre en effet la séparation des éléments du mélange précédent (Pb^{++} , Ag^+ et Hg^+) comparativement aux témoins, constitués par des solutions pures de ces cations : une

première chromatographie sur couches minces de résine Chelex 100 (H^+), à l'aide de HNO_3 2M. sépare le Pb^{++} des deux autres qui ne migrent pratiquement pas. Après séchage de la plaque à l'air, deux chromatographies successives avec une solution aqueuse de KCN à 5 % différencient Ag^+ et Hg^+ . Après ultime séchage, la révélation est effectuée par H_2S en milieu alcalin.

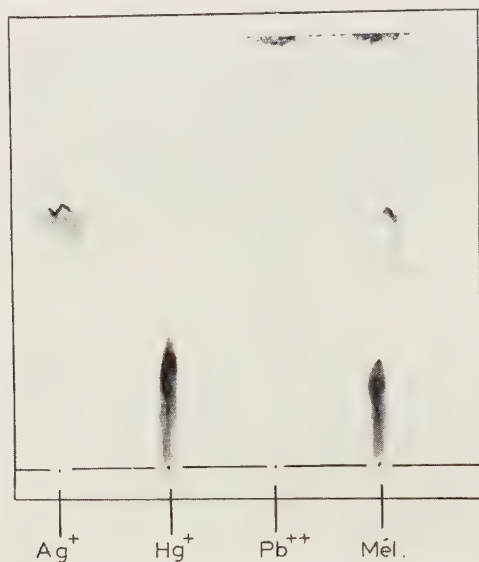


FIGURE 12

Deuxième groupe : Sb^{+++} , Bi^{+++} , Pb^{++} , Cu^{++} , Cd^{++} , Hg^{++} .

Sur résine Chelex 100 (H^+), des essais effectués avec des solutions aqueuses de concentrations variables en HNO_3 nous ont permis d'obtenir une très bonne séparation du mélange de Sb^{+++} , Bi^{+++} , Pb^{++} , Cu^{++} , Cd^{++} et Hg^{++} . La figure 13 représente le chromatogramme de ce mélange et des témoins correspondants, réalisé en phase ascendante à l'aide d'une solution aqueuse molaire de HNO_3 et sur lequel les cations ont été révélés par H_2S en milieu alcalin. Sur la reproduction photographique du chromatogramme, nous avons souligné en noir le pourtour des taches peu apparentes de Hg^{++} , Cd^{++} et Sb^{+++} . En ce qui concerne en particulier les sulfures d'antimoine et de cadmium, respectivement orangé et jaune pâle, ils impressionnent très peu les émulsions couramment utilisées pour les pellicules photographiques en noir et blanc et ne permet-

tent pas une bonne reproduction des spots de ces éléments. Les taches de Sb^{+++} et Cd^{++} sont par contre très nettes sur le chromatogramme lui-même ou sur une photographie en couleurs de celui-ci.

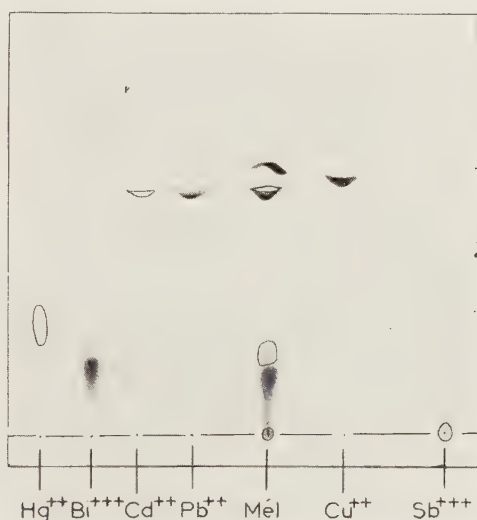


FIGURE 13

b) Groupes du sulfure d'ammonium.

Troisième groupe : Al^{+++} , Fe^{+++} , Cr^{+++} .

Quatrième groupe : Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} .

Un certain nombre d'essais préliminaires nous ont conduit finalement à entreprendre l'étude analytique globale des cations des troisième et quatrième groupes réunis. A l'aide d'une solution aqueuse de HNO_3 2M les résultats sont déjà satisfaisants, mais tous les éléments sont entraînés beaucoup trop loin, près du front du solvant. Aussi avons-nous essayé des concentrations plus faibles en HNO_3 . La figure 14 représente le chromatogramme d'un mélange de Al^{+++} , Fe^{+++} , Cr^{+++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} et Co^{++} , obtenu sur résine Chelex 100 (H^+), à l'aide d'une solution aqueuse de HNO_3 0,5 M. La révélation se fait par vaporisation d'une solution méthanolique à 0,2 % de 1-(2-pyridyl-azo)-2-Naphtol (PAN), suivie d'une exposition aux vapeurs d'ammoniaque. On obtient des spots, colorés différemment, pour chacun des éléments suivants : Mn^{++} , Co^{++} ,

Zn^{++} , Ni^{++} et Fe^{+++} . Il faut souligner que le chromatogramme lui-même, ou sa reproduction en couleurs, constituent d'excellents documents, d'une qualité bien supérieure à la reproduction en noir et blanc qui figure ici. Al^{+++} ne se révèle pas par cette méthode. Il est visible sous U.V. après vaporisation d'une solution méthanolique à 1 % d'oxine (8-hydroxyquinoléine), suivie d'une exposition aux vapeurs d'ammoniaque. Al^{+++} migre sensiblement au même niveau que Zn^{++} , mais, par l'association des deux révélations, on les différencie très facilement l'un de l'autre.

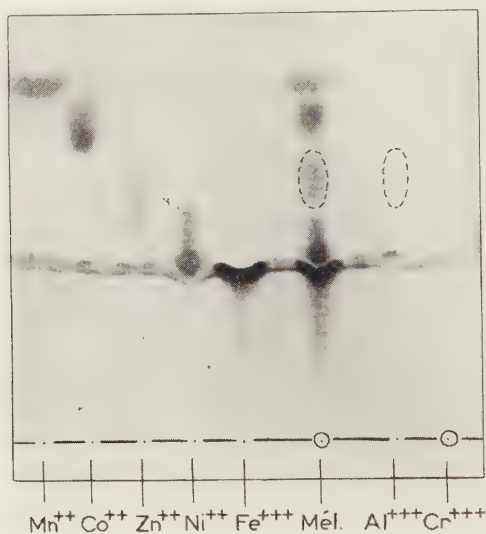


FIGURE 14

Sur la figure 14 nous avons indiqué l'emplacement de Al^{+++} , en entourant le spot de celui-ci en pointillé pour le témoin et le mélange. Quant à Cr^{+++} sa migration est nulle, mais nous n'avons pas encore réussi une révélation chimique sur la résine qui permette une reproduction photographique satisfaisante et nous avons dû, là aussi, souligner d'un trait plein le contour des spots.

Etant donné la qualité des résultats obtenus, et la similitude des éluants utilisés (HNO_3 M. et HNO_3 0,5 M.), pour la séparation des cations des deuxième, troisième et quatrième groupes, nous avons tenté sur un même chromatogramme, la résolution du mélange

des cations de ces trois groupes. Avec une concentration intermédiaire en HNO_3 , soit 0,75 M., nous avons obtenu une bonne séparation du mélange de Mn^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Fe^{+++} , Pb^{++} , Hg^{++} , Bi^{+++} et Sb^{+++} . Si l'on ajoute Al^{+++} différenciable grâce aux U.V., nous avons donc réussi à séparer jusqu'à 10 éléments en une seule opération.

Nous poursuivons actuellement la mise au point technique, afin de codifier parfaitement cette méthode qui, par sa rapidité et son caractère général, peut rendre de grands services en analyse minérale.

CHAPITRE II

COUCHES MINCES SUCCESSIVES DE NATURE DIFFÉRENTE ET JUXTAPOSÉES SUR LA MÊME PLAQUE DE VERRE

DES impératifs techniques nous ont conduits, dès nos premières expériences, à réaliser des couches minces de composition complexe, qui nous ont laissé entrevoir des perspectives intéressantes sur le développement de cette technique. Nous avons pensé qu'il était possible d'étaler côte à côte, sur une même plaque de verre, deux ou plusieurs couches minces de nature différente, au sein desquelles le mélange à séparer migrerait successivement, abandonnant ainsi progressivement ses constituants aux différents supports traversés. Il s'agit donc effectivement d'une chromatographie continue, faisant appel, au cours d'une même opération, aux pouvoirs séparateurs spécifiques de différents supports successifs et susceptible de mettre en jeu tour à tour l'adsorption, le partage, l'échange d'ions, ou même des réactions chimiques variées.

Cette méthode nous a permis de résoudre très rapidement certains problèmes analytiques complexes et d'effectuer, en une seule fois, des séparations chromatographiques irréalisables sur des couches minces constituées d'un support unique. Nos premiers essais (9) concernaient l'emploi d'une première couche de AgCl, destinée à stopper iodure et bromure radio-actifs et à les séparer ainsi des molécules organiques relativement volumineuses, qui sont ensuite chromatographiées sur la seconde couche juxtaposée de résine anionique Dowex 1 X 2. Dans ces exemples, la première couche

joue un rôle essentiellement « épurateur », vis-à-vis des halogènes contenus dans le milieu de synthèse des molécules organiques, facilitant ainsi la séparation chromatographique ultérieure de ces dernières, et l'évaluation de leur radio-activité.

D'autres expériences, réalisées depuis (12), concernent l'utilisation de deux couches minces juxtaposées à des fins véritablement « analytiques » : sur la première couche mince sont séparés les constituants d'un premier groupe de composés chimiques et, sur la deuxième, les constituants d'un second groupe, de propriétés différentes. C'est ainsi que nous avons obtenu une bonne résolution de mélanges d'anions et de cations minéraux et de mélanges de sels minéraux d'acides et de bases organiques.

Tous ces résultats ont été obtenus à l'aide de deux couches minces juxtaposées, mais il est possible d'envisager des couches triples et même quadruples, ainsi que l'adaptation de ces couches multiples à la chromatographie bidimensionnelle.

I. — PREPARATION DES COUCHES MULTIPLES JUXTAPOSEES

Lors de nos premiers essais nous avons préparé des plaques suivant la technique habituelle, entièrement recouvertes d'une couche mince de résine Dowex 1 X 2 et c'est seulement dans un deuxième temps, après séchage de cette première couche, que l'on éliminait très soigneusement une partie de celle-ci pour la remplacer par une deuxième couche mince d'AgCl. L'étalement de cette deuxième couche se faisait manuellement et malgré toutes les précautions prises, le résultat, forcément, n'était pas parfait, surtout au niveau de la jonction des deux couches. Pourtant, les premières expériences, réalisées avec les doubles couches ainsi confectionnées, donnèrent des résultats intéressants et très prometteurs pour le développement de ce nouveau mode de chromatographie. Pour pouvoir étendre le champ de nos expériences, il nous fallait résoudre le problème de la juxtaposition sur la même plaque de verre de deux couches minces de nature différente et suivant une ligne parfaitement régulière. Nous avons alors monté, par nos propres moyens, un appareil muni de deux compartiments, nous permettant d'étaler simultanément les deux couches minces sur la même plaque

de verre. Ce faisant, nous nous sommes rendus compte que le plus simple était d'utiliser l'appareillage classique de Desaga, en le modifiant de la façon suivante (fig. 15) : la partie cylindrique mobile, située à l'intérieur du dispositif, est supprimée ; seul, le châssis extérieur est conservé et sert de cuve réservoir ; les ouvertures circulaires, situées sur les côtés et servant, dans le dispositif initial, à adapter et à déplacer le cylindre mobile, sont obturées à l'aide de deux disques en plexiglas ; une cloison, de forme particulière et également en plexiglas, permet l'aménagement de deux compartiments, de longueur et de capacité variables, grâce à la possibilité de faire varier la position de cette cloison selon les besoins.



FIGURE 15

Au cours des expériences, relatées plus loin, cette cloison a été placée soit à la moitié, soit au tiers de longueur totale de l'appareil, de manière à réaliser des plaques, possédant deux couches de même longueur, ou l'une représentant environ le double de l'autre. Il est également possible de confectionner des couches triples ou quadruples juxtaposées, en utilisant simplement une ou deux autres cloisons, identiques à la première.

Il convient de donner quelques détails complémentaires sur la forme de cette cloison, que l'on distingue d'ailleurs sur la figure 15.

Pour réaliser une continuité parfaite entre les deux couches, il fallait pouvoir obtenir une étanchéité totale entre les deux compartiments ; cela a été possible grâce à un disque en plexiglas, de diamètre identique au diamètre intérieur de la cuve et prolongé par une languette, de la même largeur que l'orifice rectangulaire inférieur de l'appareil. Cette languette, taillée en biseau, présente une arête rectiligne très fine, située, au cours de l'étalement, au contact de la plaque de verre. On obtient ainsi l'étanchéité désirée entre les deux compartiments et une juxtaposition très régulière des deux couches sur la plaque de verre. Le procédé d'étalement diffère très peu de la technique habituelle ; il suffit de préparer séparément les deux suspensions, de nature différente et d'introduire chacune d'elles dans le compartiment désiré, juste avant l'étalement.

II. — DOUBLES COUCHES

« RESINE ANIONIQUE/RESINE CATIONIQUE »

Les résultats satisfaisants, obtenus dans la séparation sur simple couche de résine, soit des halogènes, soit des cations alcalins ou alcalino-terreux (8-10), nous ont incité à expérimenter la technique des couches multiples juxtaposées, pour résoudre des mélanges minéraux plus complexes. C'est ainsi que les divers anions et cations, contenus dans des solutions aqueuses d'halogénures alcalins ou alcalino-terreux, ont pu être aisément séparés en chromatographiant ces solutions sur deux couches juxtaposées de résines échangeuses d'ions, l'une anionique (Dowex 1 X 2 ou 1 X 10), l'autre cationique (Dowex 50 W.X.2, Amberlite CG. 120 ou Chelex 100).

1°) MÉLANGE D'HALOGÉNURES ALCALINS.

Les trois sels suivants ont été utilisés : NaI, KBr et CsCl et leur solution aqueuse a été additionnée des isotopes radio-actifs correspondants, à savoir : ^{131}I , ^{82}Br , ^{36}Cl , ^{24}Na , ^{42}K et ^{134}Cs . Cette technique de dilution isotopique permet ainsi de suivre plus efficacement la séparation de chacun des constituants. Une première couche de résine anionique Dowex 1 X 10 (Cl^-) différencie d'abord les trois halogènes, alors qu'une seconde couche de résine cationique Dowex 50 W.X.2 (H^+), juxtaposée à la première, et d'égale longueur, sépare les alcalins. En ce qui concerne la solution éluante, on avait constaté au cours des expériences antérieures que l'ion NO_3^- , sous

la forme d'une solution aqueuse de NaNO_3 M., convenait parfaitement pour les halogènes et que l'ion Li^+ séparait correctement les trois alcalins précédents. Nous avons donc pensé qu'en associant ces deux ions, sous la forme d'une solution aqueuse molaire de LiNO_3 , nous aurions ainsi un solvant convenable pour résoudre le mélange d'halogénures alcalins. L'expérience s'est avérée concluante et la figure 16 rend compte de la séparation des divers anions et cations.

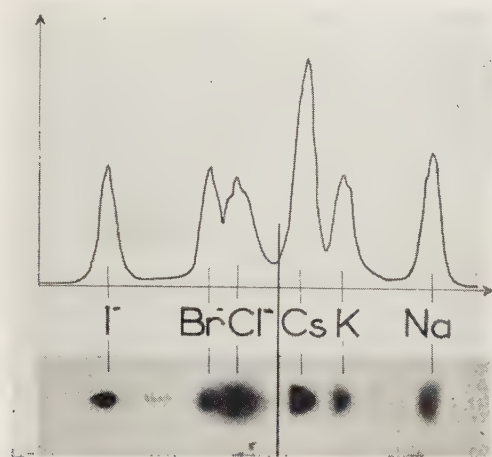


FIGURE 16

A la partie inférieure se trouve l'autoradiographie du chromatogramme réalisé sur les deux couches juxtaposées et à la partie supérieure la courbe obtenue par passage de la plaque au compteur G.M., et qui représente la radio-activité respective de chaque isotope séparé.

Nous avons réalisé également une séparation du même mélange et avec le même éluant (LiNO_3 M.), sur double couche résine anionique Dowex 1 X 10 (Cl^-), résine cationique Amberlite CG. 120 (H^+) et les résultats se sont révélés tout aussi satisfaisants.

2°) MÉLANGE D'HALOGÉNURES ALCALINO-TERREUX.

Nous avons utilisé pour ces essais les solutions aqueuses des sels suivants : CaBr_2 , SrI_2 , BaCl_2 , additionnées là aussi, des isotopes radio-actifs correspondants : les anions des trois halogènes employés dans l'expérience précédente et les cations alcalino-terreux ^{45}Ca ,

^{89}Sr et ^{131}Ba . Nous avons d'abord expérimenté des couches du même type que précédemment, c'est-à-dire Dowex 1 X 10 suivie de Dowex 50 W.X.2 ou Amberlite CG. 120, mais, si elles ont conduit toujours à une excellente séparation des halogènes, aucun des nombreux solvants essayés (NO_3NH_4 M., mélange à parties égales de NO_3NH_4 M. et de lactate d'ammonium M.), ne nous a permis de séparer les alcalino-terreux sur la seconde couche. Nous avons alors inversé l'ordre des couches, c'est-à-dire que la chromatographie ascendante des alcalino-terreux est réalisée en premier sur résine aminodiacétate Chelex 100 (Na^+), suivie de celle des halogènes sur une seconde couche de résine anionique Dowex 1 X 10 (Cl^-), qui recouvre la seconde moitié de la plaque.

Pour choisir un solvant unique, convenant à la fois aux cations et aux anions, nous avons tenu compte évidemment des résultats antérieurs, comme dans l'expérience précédente et nous nous sommes arrêtés à une solution aqueuse de NH_4NO_3 2M. Un solvant aqueux constitué par un mélange à parties égales de NH_4NO_3 2M. et de NH_4Cl 2M., donne également de bons résultats.

La figure 17 représente l'autoradiographie d'un chromatogramme du mélange précédent, réalisé sur une grande plaque, avec NH_4NO_3 2M. comme éluant. Elle montre, parallèlement aux témoins correspondants, une excellente séparation des alcalino-terreux sur la première couche de Chelex 100 (Na^+), qui laisse migrer les halogènes ; ces derniers sont séparés ensuite correctement sur la seconde couche de Dowex 1 $\times$ 10 (Cl^-).

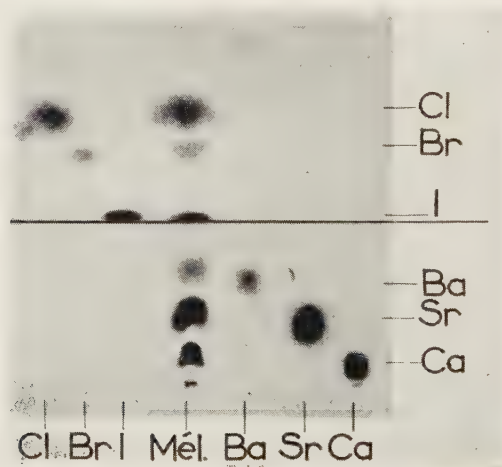


FIGURE 17

La figure 18 montre encore l'autoradiographie d'un chromatogramme du même type, mais effectuée sur une petite plaque. Les activités de chaque isotope séparé, mesurées au compteur G.M., sont objectivées par la courbe correspondante, située à la partie supérieure de la figure.

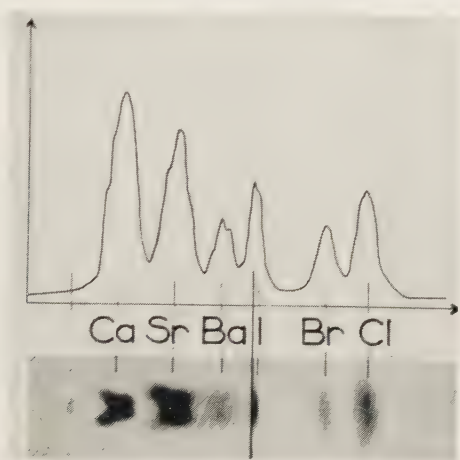


FIGURE 18

III. — COUCHE « REACTIVE »/RESINE CATIONIQUE

L'utilisation soit à l'état pur, soit incorporés à un support polyvalent, tel que la cellulose ou le gel de silice, de réactifs chimiques variés (chélateurs, agents de précipitation minéraux ou organiques) permet d'obtenir de véritables couches « réactives », utilisables seules ou juxtaposées à d'autres couches de nature différente. Les premiers essais de cet ordre ont été entrepris pour résoudre un mélange de Fe^{+++} , Ni^{++} et Co^{++} , difficilement séparables sur des couches minces de cellulose pure et que nous n'avions pas encore résolus sur couche mince de résine cationique. La double couche confectionnée selon la technique habituelle, est constituée par :

une première couche « réactive », recouvrant le premier tiers de la plaque et obtenue par étalement d'une suspension aqueuse composée de cellulose MN. 300 (3 g.), de diméthylglyoxime (0,10 g.) et d'eau distillée (q.s.p. 35 ml.) ;

— une seconde couche, recouvrant le reste de la plaque, juxtaposée à la précédente et constituée par le mélange habituel de cellulose et de résine cationique de type Dowex 50 W.X.2 (NH_4^+).

Le mélange des cations à séparer est déposé sur la ligne de départ, elle-même située au milieu de la couche de diméthylglyoxime et une chromatographie ascendante est réalisée à l'aide d'un solvant composé d'eau distillée (70 ml.), d'éthanol (20 ml.), d'acide tartrique (5 g.) et d'ammoniaque (q.s.p. odeur persistante). Le nickel est stoppé sur la ligne de départ, sous forme d'oxime colorée, alors que le fer et le cobalt, complexés, sont entraînés jusqu'à la seconde couche de résine ; une partie du cobalt reste sur la ligne de séparation des deux couches et le reste se répartit successivement en plusieurs taches, dont la coloration peut être accentuée par pulvérisation d'une solution aqueuse de sulfure de sodium ; ces taches correspondent vraisemblablement à des complexes du type cobaltamines. Le fer, probablement sous forme de complexe tartrique soluble, n'est pratiquement pas retenu par la résine et migre avec le front du solvant.

IV. — DOUBLES COUCHES

« RESINE ANIONIQUE OU CATIONIQUE GEL DE SILICE »

Devant les résultats positifs obtenus sur des mélanges d'ions minéraux, nous avons pensé qu'il serait possible également de résoudre des mélanges plus hétérogènes, contenant par exemple des sels minéraux d'acides organiques (sels alcalino-terreux de diacides aliphatiques) ou des sels de bases organiques et d'acides minéraux (halohydrates d'alcaloïdes). Des techniques de séparation d'alcaloïdes et de diacides organiques sur couches minces de gel de silice ayant été récemment proposées (3-4), nous avons tenté de réaliser la chromatographie des mélanges organo-minéraux précédents, sur des plaques recouvertes par moitié d'une couche de résine anionique ou cationique et d'une couche de gel de silice. Dans un premier temps, et alors que la résine retient fortement les ions minéraux, un solvant organique entraîne les molécules organiques jusqu'à la seconde couche de silice, où elles subissent une séparation chromatographique. En général, le solvant organique, de force ionique faible, s'avère incapable d'amorcer sur la résine une sépa-

ration des ions minéraux. Cette première couche de résine pourrait être ainsi uniquement utilisée pour stopper en bloc les ions minéraux, accompagnant des molécules organiques, seules intéressantes à séparer sur la couche de silice. Il s'agirait alors d'une première couche « épurative » et d'une seconde couche véritablement « analytique ». Dans le cas où la séparation complète des ions minéraux est également intéressante, la première couche de résine, à son tour, est soumise seule, à un second solvant, en général une solution aqueuse d'un sel minéral.

1°) HALOHYDRATES D'ALCALOÏDES.

Nous avons travaillé avec une solution aqueuse de bromhydrate d'atropine, d'iodhydrate de cocaïne et de chlorhydrate de morphine, additionnée de traces d'halogénures radio-actifs correspondants. Comme dans le cas des ions minéraux, l'idéal aurait été de trouver un solvant mixte, séparant en une seule opération : les halogènes sur la première couche de résine, puis les alcaloïdes sur la seconde couche de silice, juxtaposée à la première. Cela n'a pu être réalisé : en effet, un solvant tel qu'une solution de NH_4NO_3 molaire dans un mélange à parties égales d'acétone et de méthanol, entraîne les halogènes non seulement sur la couche de résine, mais également au-delà, sur la couche de silice et perturbe de ce fait, la séparation des alcaloïdes. Il nous a donc fallu opérer en deux temps (développements répétés). Au cours d'une première chromatographie ascendante, un solvant organique polaire, préconisé par J. Baumler et S. Rippstein (3), composé de méthanol et d'acétone à parties égales, migre jusqu'à l'extrémité supérieure de la plaque. Les halogènes ne sont pas séparés pendant cette première opération et sont retenus au point de départ, sur la première couche de résine anionique Dowex 1 X 10 (OH^-). Par contre, les alcaloïdes-bases libérés sont entraînés jusqu'à la seconde couche de silice (Kieselgel, G. Merck), où le solvant organique sépare dans l'ordre : l'atropine, la morphine et la cocaïne, qui seront révélées ultérieurement par pulvérisation d'une solution aqueuse iodo-iodurée (réactif de Bouchardat) (fig. 19).

Les R_f , mesurés à partir de la ligne de séparation des deux couches, sont comparables aux R_f de ces substances, séparées directement sur une couche unique de silice.

On isole alors les deux couches, au niveau de leur ligne de séparation, en enlevant la substance sur une largeur de un à deux

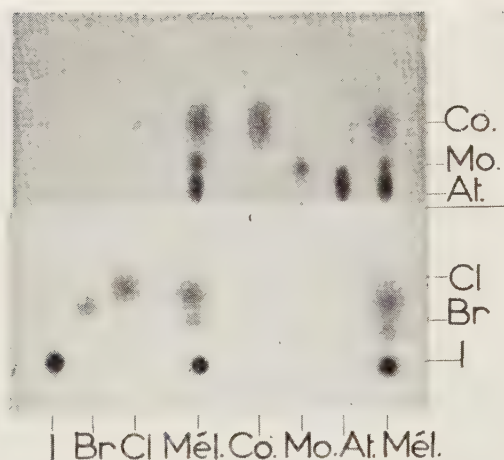


FIGURE 19

millimètres. Après évaporation complète du solvant organique, on soumet la chromatoplaque à une seconde chromatographie ascendante, à l'aide d'une solution aqueuse de NaNO_3 M., qui migre uniquement sur la première couche de résine Dowex 1 X 10 et s'arrête à la ligne de discontinuité précédemment tracée. Les halogènes sont séparés au cours de cette seconde opération et la plaque est soumise soit à une autoradiographie, soit à une mesure au compteur G.M., qui détectent les spots radio-actifs correspondants.

La figure 19 montre à sa partie supérieure la reproduction photographique de la couche de silice, sur laquelle ont été révélés les alcaloïdes séparés et les témoins correspondants ; à sa partie inférieure, se trouve l'autoradiographie de la couche de Dowex 1 X 10, où l'on distingue les spots des trois halogènes et de leurs témoins.

La figure 20 montre, superposée à l'autoradiographie de la plaque, la courbe de radio-activité correspondante (compteur G.M.) et à la partie inférieure, les spots des trois alcaloïdes révélés sur la seconde couche de silice.

2°) SELS ALCALINO-TERREUX DE DIACIDES ALIPHATIQUES HOMOLOGUES.

Nous avons opéré sur un mélange d'oxalate de calcium, de succinate de strontium et d'adipate de baryum, mis en suspension homogène dans de l'eau distillée et additionné de traces des cations radio-actifs correspondants. Comme dans le cas du mélange d'halo-



FIGURE 20

hydrates d'alcaloïdes, nous avons tout d'abord cherché un solvant mixte capable de séparer en une seule opération alcalino-terreux et diacides ; mais là encore, aucun des solvants essayés n'a donné des résultats satisfaisants et il a fallu avoir recours à deux chromatographies successives. Comme précédemment, on effectue une première chromatographie ascendante à l'aide d'un solvant hydroalcoolique ammoniacal, composé d'éthanol à 96° (100 ml.), d'ammoniaque à 25 % (16 ml.) et d'eau distillée (12 ml.), d'après D. Braun et H. Geenen (4) ; on laisse migrer ce solvant jusqu'à l'extrémité supérieure de la plaque. Les alcalino-terreux restent fixés en bloc sur la ligne de départ, située au début de la première couche de résine cationique Dowex 50 W.X.2 (H^+). Les diacides libérés : oxalique (C_2), succinique (C_4), adipique (C_6), sont entraînés sous forme de sels d'ammonium, jusqu'à la seconde couche de silice, où ils sont séparés en fonction de leur poids moléculaire et de leur solubilité dans ce premier solvant. Ils sont révélés ultérieurement par pulvérisation du réactif suivant :

Pourpre de bromocrésol	0,04 g.
Méthanol (solution aqueuse concentrée)	16,5 ml.
Ethanol	83,5 ml.

Le pH de ce réactif est ajusté à 5,0 à l'aide de NaOH 0,1 N. Les

diacides apparaissent alors sous forme de taches claires sur fond bleu.

Après évaporation du premier solvant et isolement des deux couches selon le procédé déjà décrit, on soumet le mélange des cations alcalino-terreux, fixé près de la ligne de départ, à une seconde chromatographie ascendante, à l'aide de la solution aqueuse de lactate d'ammonium 0,75 M, déjà utilisée au cours de nos expériences antérieures. On laisse ce solvant migrer jusqu'à l'extrémité de la première couche de résine Dowex 50 W.X.2, et après séchage à l'air libre, les spots radio-actifs, correspondant aux alcalino-terreux séparés, sont détectés au compteur G.M. et la plaque est ensuite autoradiographiée.

La figure 21 montre à sa partie inférieure, l'autoradiographie de la première couche, où l'on distingue les spots des cations séparés et des témoins correspondants et à sa partie supérieure, juxtaposée à la première, la reproduction photographique de la seconde couche de silice sur laquelle sont relevés les spots des diacides et des témoins respectifs, dont le contour a été finement souligné de noir.

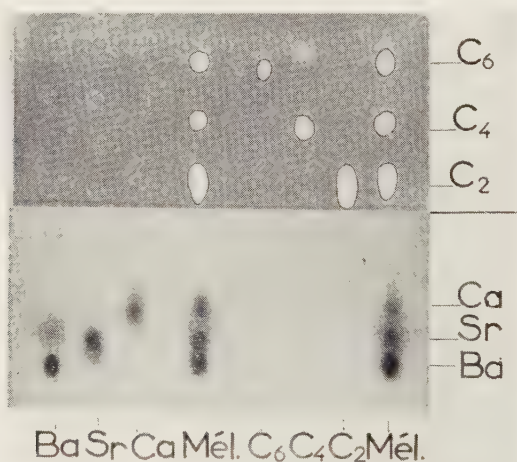


FIGURE 21

Sur la figure 22, on distingue de haut en bas : la courbe de radio-activité, mesurée au compteur G.M., avec les pics des trois alcalino-terreux, dont les spots sont également visibles sur l'autoradiographie, située en-dessous. A la partie inférieure, on distingue

enfin la reproduction photographique de la seconde couche de silice, après révélation des diacides séparés.

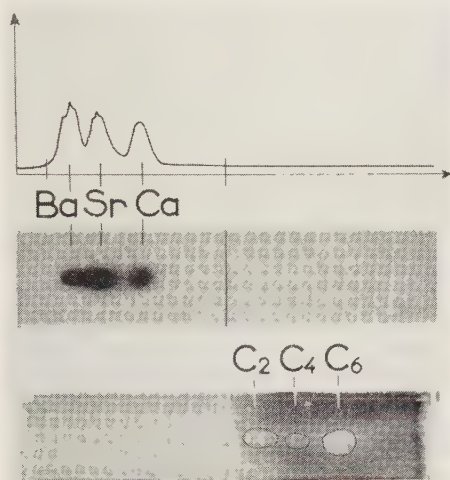


FIGURE 22

V. — DOUBLES COUCHES « AgCl/RESINE ANIONIQUE »

Ces plaques sont constituées, pour le premier tiers, d'une couche de chlorure d'argent et pour les deux autres, d'une couche de résine anionique. Si l'étalement se fait suivant la technique habituelle, la préparation du chlorure d'argent nécessite quelques précautions. Une solution aqueuse à 10 % environ de AgNO_3 est additionnée de HNO_3 concentré et de NaCl en excès. Il se forme un abondant précipité de AgCl , que l'on agite fortement avec de l'eau distillée de façon à obtenir des grains très fins et très réguliers. Après plusieurs lavages à l'eau distillée et plusieurs décantations successives, le précipité est mélangé au mortier avec un peu de cellulose MN. 300, remis en suspension dans de l'eau distillée et le liquide obtenu est introduit dans le dispositif d'étalement. Pendant toutes ces manipulations, il est préférable d'opérer à l'abri de la lumière et de laisser sécher ensuite les plaques à l'obscurité, pour éviter un noircissement trop accentué du chlorure d'argent.

1°) MÉLANGES D'HALOGENURES, DE TCF ET DE SES DERIVÉS HALOGENÉS.

Au cours de la séparation, sur résine Dowex 1 X 2 (OH⁻), des dérivés de la tétrachlorofluorescéine diversement halogénés, un problème analytique subsistait. Il s'agissait d'obtenir une séparation correcte d'une part des halogénures radioactifs ⁸²Br⁻ et ¹³¹I⁻, contenus dans le milieu de synthèse, et d'autre part des colorants les plus halogénés, phloxine ou rose Bengale. Les halogénures minéraux sont, en effet, énergiquement fixés par la résine, alors que phloxine et rose Bengale ne sont pas entraînés par le solvant employé. Il en résulte, que la radio-activité, mesurée au niveau du spot coloré de ce dernier (fig. 3, courbe 3) correspond en réalité à la somme des activités de l'iodure en excès et du rose Bengale.

La technique des couches multiples juxtaposées a permis là encore, de résoudre ce problème. Le mélange des dérivés iodés contenant l'iodure radioactif est déposé sur une ligne de départ, située sur la première couche de chlorure d'argent. Au cours de la chromatographie, l'iodure radio-actif est retenu au départ, sous forme de AgI, alors que tous les autres composés organiques, même le rose Bengale, sont entraînés par le solvant déjà utilisé précédemment, composé d'acide acétique, méthanol, acétone, butanol (35-20-15-5). Une seconde couche de résine Dowex 1 X 2 (OH⁻), juxtaposée à la première, permet de réaliser, comme dans les expériences antérieures, une séparation satisfaisante des différents colorants (fig 3, courbe 4).

2°) MÉLANGES D'IODURE ET D'ACIDES AMINÉS THYROÏDIENS.

La séparation des principaux acides aminés thyroïdiens, marqués à ¹³¹I et de l'iode minéral radio-actif, a été réalisée sur colonne de résine Dowex 1 × 2 par P. Blanquet, G. Meyniel et collaborateurs (80-14). Pour réduire considérablement l'importance des prises d'essai, nous avons pensé à remplacer les colonnes par des couches minces de la même résine. Le problème n'est pas simple, car avec des molécules organiques relativement volumineuses, le phénomène d'échange d'ions n'est plus le phénomène essentiel et il faut tenir compte très largement d'autres phénomènes : adsorption, attraction polaire et effet de tamis, dont l'importance est liée au nombre d'halogènes. De nombreux essais préliminaires sur couches minces de résine Dowex 1 X 2 (OH⁻, SO₄²⁻, Cl⁻), avec des solvants à base de butanol acétique ou de butanol ammoniacal, ne nous ont jamais

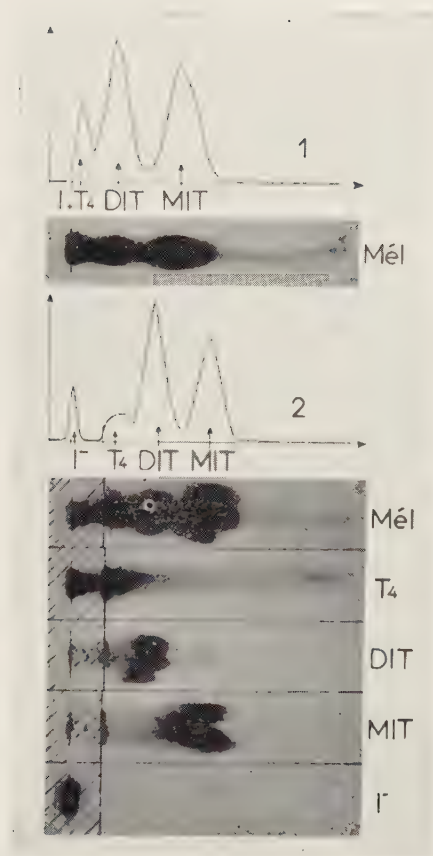


FIGURE 23

donné des résultats très satisfaisants. Il fallut utiliser un éluant aussi énergétique que KOH 3 N. dans le méthanol, pour obtenir une bonne séparation des I^- , DIT et MIT, contenus dans l'extrait butanolique d'un hydrolysats thyroïdien fortement radioactif. La prise d'essai étant extrêmement faible et la révélation des acides aminés par la ninhydrine ne donnant pas de ce fait de coloration appréciable, nous avons pu identifier les pics de radioactivité observés sur le chromatogramme, par la méthode des témoins internes. L'addition à l'extrait d'une forte quantité de $^{131}I^-$ a permis de confirmer la rétention intense des iodures près de la ligne de dépôt ; l'addition à l'extrait de quantités appréciables de MIT et de DIT a permis également, après révélation par la ninhydrine, de confirmer la nature des substances radioactives repérées et la séparation par ordre de mobilité croissante des iodures, puis de la diiodotyrosine (DIT) et de la mono-iodotyrosine (MIT). Enfin, l'addition à l'extrait d'une forte quantité de thyroxine (T4), marquée à ^{131}I a permis de localiser le pic dû à ce composé, situé pratiquement au même endroit d'ailleurs que le pic des iodures. Nous nous heurtons donc là, à des difficultés identiques à celles rencontrées avec le rose Bengale. Molécule tétra-iodée relativement volumineuse, en regard de la M.I.T. et de la D.I.T., la T₄ est solidement retenue par la résine anionique et n'est pratiquement pas séparée de l'iodure radio-actif. C'est donc la radio-activité globale du bloc iodure et thyroxine, qui est mesurée au compteur G.M. et mise en évidence également par autoradiographie du chromatogramme correspondant (fig. 23, courbe 1).

Déjà employé sur colonne par Fletcher (38) en 1957 pour séparer les iodures des acides aminés iodés urinaires, le chlorure d'argent nous a permis comme précédemment de résoudre le problème. Une première couche mince de AgCl, préparée selon la technique déjà décrite, stoppe l'iodure radio-actif sur la ligne de dépôt et laisse migrer tous les acides aminés iodés. La thyroxine est arrêtée ensuite par la seconde couche de résine Dowex 1 X 2 (OH^-) alors que la DIT et la MIT migrent dans l'ordre. Des mesures de radio-activité, ainsi que l'autoradiographie des chromatogrammes du mélange et des substances pures témoins (fig. 23, courbe 2) confirment l'ordre de cette séparation et mettent en évidence la présence d'une quantité importante d'iodure dans la thyroxine utilisée.

CHAPITRE III

FEUILLES CHROMATOGRAPHIQUES KODAK

A côté des multiples avantages apportés par la chromatographie sur couches minces, subsiste la servitude incontestable que représente, pour un laboratoire de contrôle analytique, la préparation systématique de nombreuses chromatoplaques de qualité constante.

Les Laboratoires de recherche de la Société KODAK-PATHE (France) ont, semble-t-il, résolu le problème, en mettant au point une couche chromatographique ultra-mince, fixée sur un support souple et inaltérable en polyester. Ces feuilles chromatographiques qui viennent d'être commercialisées, ont été soumises à une expérimentation très poussée, et les premiers résultats obtenus sont déjà du plus haut intérêt. La couche chromatographique est directement prête à l'emploi ; elle est stable et n'engendre aucune modification notable de la technique chromatographique sur couches minces classique.

I. — GENERALITES

1°) PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES.

Les feuilles chromatographiques sont incolores, de dimensions réduites et constituées :

— par un support, remplaçant la plaque de verre, en polyester

souple, transparent, isolant, très résistant et insensible à la plupart des solvants,

— et par une couche chromatographique très mince, adhérente au support précédent, poreuse et peu fragile, de nature variable, minérale ou organique, au sein de laquelle peuvent se déplacer régulièrement les solvants d'élution.

L'épaisseur du support en polyester est d'environ 150 microns ; celle de la couche chromatographique est constante et voisine de 50 microns. L'ensemble du film est très souple et peut être facilement roulé en cylindre ou en cône, si la technique le requiert. La couche chromatographique est directement prête à l'emploi et sa très grande efficacité de séparation permet d'utiliser de très courtes migrations (4 à 6 cm. environ). Il en découle deux conséquences pratiques capitales :

- les cuves sont de très petites dimensions,
- et la durée d'analyse est réduite (20 à 60 minutes).

D'autres avantages sont à signaler : la conservation et l'archivage des chromatogrammes ne posent aucun problème, ce qui est particulièrement important dans les laboratoires de contrôle ; les films peuvent être rendus translucides, soit par trempage, soit par exposition aux vapeurs d'un solvant convenable, soit encore par imprégnation avec de la paraffine fondue.

Toutes les techniques chromatographiques classiques peuvent être mises en œuvre, de même que l'électrophorèse.

Quant aux techniques de révélation et aux procédés de mesure quantitative, ils sont les mêmes que ceux utilisés en chromatographie sur papier.

2°) DIFFÉRENTS TYPES DE FEUILLES CHROMATOGRAPHIQUES.

a) *les feuilles chromatographiques à couches minérales.*

— *le type K 301 V* est recouvert d'une couche de silice spéciale pour chromatographie, qui possède les mêmes propriétés que les couches de silice réalisées sur plaques de verre avec les adsorbants classiques. Ces feuilles sont surtout recommandées pour les chromatographies d'adsorption et peuvent subir soit une activation, soit une désactivation. La couche résiste à une révélation par les acides concentrés à froid.

b) *les feuilles chromatographiques à couche organique.*

Les couches organiques ne sont pas réalisées suivant la méthode

habituelle, à partir d'une poudre de polymère mélangée avec un liant, mais elles sont obtenues grâce à un procédé de fabrication nouveau et original, qui consiste en la mise en solution d'un polymère organique dans un mélange de solvants choisis de telle manière qu'au séchage se produise une microprécipitation du composé macromoléculaire. Ce procédé confère à la couche une extrême finesse de structure et une très grande homogénéité.

— le type K 511 V est recouvert d'une couche organique inerte préparée à partir d'un polycarbonate. Cette couche non adsorbante est utilisable pour des séparations par partage ; le caractère hydrophile de la couche peut être augmenté par imprégnation à l'aide d'un sel ou d'un mélange de sels ou encore de toute autre substance hydrosoluble. Mais à part quelques limitations d'emploi, dues au principe même de la fabrication, les systèmes de solvants sont assez voisins de ceux utilisés habituellement sur les supports en papier. La révélation par les acides concentrés est possible à chaud et à froid.

— le type K 541 V est recouvert d'une couche organique spéciale préparée à partir d'un polyamide. Cette couche est recommandée pour les chromatographies de partage et constitue un très bon support pour la séparation sur couche « imprégnée ». Elle possède, en outre la qualité intéressante, due à sa nature chimique, de bien se prêter à la séparation des phénols et des dérivés aromatiques nitrés. Par contre, la révélation par les acides concentrés est impossible sur cette couche.

3°) UTILISATION DES FEUILLES CHROMATOGRAPHIQUES.

a) *feuilles utilisées directement* (chromatographie d'adsorption).

Le mode opératoire est pratiquement le même que celui suivi avec des couches minces classiques.

Les solutions à analyser, dont la concentration est en moyenne de 0,1 %, sont déposées à l'aide de micro-pipettes à environ 10 mm. du bord inférieur de la feuille, sous forme de taches de petites dimensions, ayant environ 2 mm. de diamètre et espacées d'au moins 6 mm.

La feuille est alors suspendue dans la cuve, au-dessus du niveau du solvant choisi ; après fermeture et saturation de la cuve, elle est immergée avec précaution de 2 à 3 mm. dans le liquide.

Après 10 à 60 minutes, selon la vitesse d'ascension du solvant, le chromatogramme est retiré et les différentes substances séparées sont révélées, si cela est nécessaire.

Il est possible de repérer sur ces couches, au stylo à bille ou au crayon, des zones ainsi révélées. Le chromatogramme séché peut alors être facilement collé ou agrafé dans un cahier de laboratoire, un rapport ou un dossier.

b) Feuilles utilisées après imprégnation (chromatographie de partage).

Dans le cas où la couche doit être traitée avant chromatographie afin d'y inclure un sel, un mélange tampon ou un liquide peu volatil, la feuille chromatographique est complètement immergée pendant quelques secondes dans la solution d'imprégnation, puis elle est placée entre deux papiers filtres et soumise à un léger essorage. Elle est ensuite séchée par de l'air chaud si le traitement est réalisé avec une solution d'un produit non volatil, ou laissée à l'air dans le cas contraire.

II. — APPLICATIONS

1°) PREMIERS RÉSULTATS ANALYTIQUES.

Nous avons résumé dans les tableaux suivants quelques exemples de séparation de composés organiques, obtenues à l'aide de techniques mises au point au service de chimie analytique des laboratoires de recherches Kodak-Pathé. L'intérêt des résultats présentés est évident et ne nécessite, de notre part, aucun commentaire particulier.

2°) FEUILLES CHROMATOGRAPHIQUES A BASE DE RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS.

Les premiers échantillons de feuilles chromatographiques de résines échangeuses d'ions Dowex 1 X 2 anionique (type K 521 V) et Dowex 50 W.X.2 cationique (type K 522 V) ont été préparés sur notre demande par la firme Kodak-Pathé. Nous avons immédiatement entrepris une expérimentation de ces nouvelles couches. Nous avons tout particulièrement cherché à reproduire les séparations

TABLEAU 13

<i>Couche</i>	ACIDES AMINÉS				SUCRES		2,4-D.N.P.H.
	K 511 V Tamponnée/ Phosphates 0,2 M	K 511 V Tamponnée/ Phosphates 0,2 M	K 511 V Tamponnée/ Phosphates 0,2 M	K 511 V Traitée à acétate de Na0,2 M	K 511 V Tamponnée/ Phosphates 0,2 M	K 511 V	
<i>Solvant</i>	Ethanol 85 Eau 15	Ethanol 85 Eau 13 NH ₄ OH conc. 2	N. butanol 90 HCl N/100 10	N. butanol 50 Eau 8	N. propanol 50 Ac. d'éthyle 10 Eau 5	Cyclohexane saturation de diméthylformamide	
Rf							
0,0			Arginine, histidine Glycocolle Lysine, sérine Ac. glutamique Ac. aspartique Proline Alanine			Glyoxal	
0,1	Lysine						
	Arginine	Lysine			Lactose		
0,1	Histidine Sérine	Arginine		Arginine	Galactose		
0,2	Ac. aspartique Glycocolle			Glycocolle Proline Alanine			
0,3		Ac. aspartique	Méthionine		Glucose	Furfural	
0,4	Ac. glutamique		Leucine		Mannose		
0,4	Proline	Glycocolle Sérine	Phénylalanine			Formol	
0,5	Alanine	Ac. glutamique proline	Tryptophane		Xylose		
0,6		Alanine					
0,7	Pyrosine	Histidine				Acétaldéhyde	
0,8	Phénylalanine Tryptophane Leucine	Tryptophane Leucine Tyrosine					
0,9		Phénylalanine		Leucine	Rhamnose	Acétone	
1						Méthyl éthylcétone	

TABLEAU 13 (suite)

Couche...	ACIDES ORGANIQUES					CATIONS MÉTALLIQUES		
	K 541 V	K 541 V	K 301 V	K 511 V	K 511 V	K 511 V	K 511 V	K 511 V
<i>Solvant.</i>	Chloroforme	CCl ₄ Diméthyl- formamide 10	90 N butanol Eau 20 Ac. acétique 5	75 Ethanol 20 NH ₄ OH conc. 10	90 N. butanol NH ₄ OH conc. 10	90 N. butanol HCl N. 15	90 N. butanol Ac. acétique 5	95 N. butanol HCl N. 5
Rf. 0,0				Ac. oxalique		Ag ⁺	Ag ⁺ Fe ⁺⁺⁺	Ag ⁺
0,1	Acide hydroxy- naphthoïque	Hydroquinone monosulfoné et anthraqui- none mono- sulfoné	Hydroquinone					
0,2			Monosulfoné	Ac. tartrique	Ac. glycolique	Ni ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Fe ⁺⁺⁺
0,3			Anthraquinone	Ac. malonique	Ac. lactique	Co ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Cu ⁺⁺
0,4			Monosulfoné	Ac. malique Ac. succinique		Cu ⁺⁺		Ni ⁺⁺
0,5	Hydroxy- naphthamide	Génol	Génol	Acide			Co ⁺⁺ Ni ⁺⁺	
0,6			Phénidone A	Glutarique		Fe ⁺⁺⁺		Zn ⁺⁺
0,7		Phénidone A	Phénidone B hydroquinone	Ac. glycolique		Zn ⁺⁺		
0,8		Phénidone B		Ac. lactique				Co ⁺
0,9								
1								

TABLEAU 14

	COLORANTS HYDROSOLUBLES			MÉLANGE DE STAHL	COLORANTS POUR USAGE ALIMENTAIRE	
	K 511 V	K 511 V	K 301 V		K 511 V	K 301 V
Couche.	N. butanol 96 NH ₄ OH conc. 4	N. butanol 95 HCl N. 5	Ac. d'éthyle 30 Méthanol 15 NH ₄ OH conc. 2,5 Eau 2,5	Benzène	N. butanol 40 Méthanol 10 NH ₄ OH conc. 2	Ac. d'éthyle 20 Méthanol 20 NH ₄ OH conc. 5
Rf 0,0	Bleu de méthylène	Bleu de méthylène			Noir brillant BN Bleu d'indanthrène	Noir brillant BN Bleu d'indanthrène
0,1	Fluorescéine			Indophénol	Bleu patenté Bordeaux S	Bleu patenté Bordeaux S
0,2			Pourpre de Bromocrésol	Rouge Soudan G	Nouvelle cocine Nacarat	Nouvelle cocine Tartrazine
0,3	Pourpre de bromocrésol		Erythrosine Vert de bromocrésol Bleu de bromocrésol Rose Bengale		Tartrazine	Jaune de quinoléine Chrysoïne
0,4	Vert de bromocrésol	Rouge de méthyle Violet cristal			Ponceau RR	Ponceau cristal- lisé Rouge solide Jaune soleil Ponceau RR Ecarlate GN
					Bleu acide brillant Ponceau cristallisé Rouge solide	Bleu acide brillant

TABLEAU 14 (suite)

COLORANTS HYDROSOLUBLES				MÉLANGE DE STAHL	COLORANTS POUR USAGE ALIMENTAIRE	
Couche	K 511 V	K 511 V	K 301 V	K 301 V	K 511 V	K 301 V
Solvant	N. butanol 96 NH ₄ OH conc. 4	N. butanol 95 HCl N. 5	Ac. d'éthyle 30 Méthanol 15 NH ₄ OH conc. 2,5 Eau 2,5	Benzène	N. butanol 40 Méthanol 10 NH ₄ OH conc. 2	Ac. d'éthyle 20 Méthanol 20 NH ₄ OH conc. 5
0,5	Bleu de bromophénol	Vert brillant Vert malachite	Rouge de méthyle Méthyle orange		Jaune soleil	
0,6			Bleu de méthylène	Diméthylamino- azobenzène ou jaune de beurre	Jaune de quinoléine Nacarar Chrysoïne	
0,7	Rouge de méthyle Erythrosine Violet cristal				Ecarlate GN	Jaune de quinoléine
0,8	Bleu de bromothymol Thymol sulfonephthaléine Rose		Violet de méthyle Thymol sulfone phthaléine Vert malachite		Jaune de quinoléine	
0,9	Bengale Vert brillant Vert malachite	Pourpre de bromocrésol Vert de bromocrésol Fluorescéine Bleu de bromothymol	Vert brillant			

obtenues sur couches minces des mêmes résines et décrites précédemment.

a) *Halogènes*. Un mélange d'halogénures radioactifs, contenant $^{36}\text{Cl}^-$, ^{82}Br et $^{131}\text{I}^-$, a été soumis à une chromatographie ascendante, sur film de résine anionique Dowex 1 X 2 (Cl^-), à l'aide du solvant habituel, à savoir une solution aqueuse molaire de NaNO_3 .

La figure 24 montre l'autoradiographie du chromatogramme obtenu et les témoins, effectués parallèlement avec les solutions pures des trois halogènes confirment l'excellente séparation, en tous points comparable à celle obtenue avec les couches minces classiques, étalées sur plaques de verre.

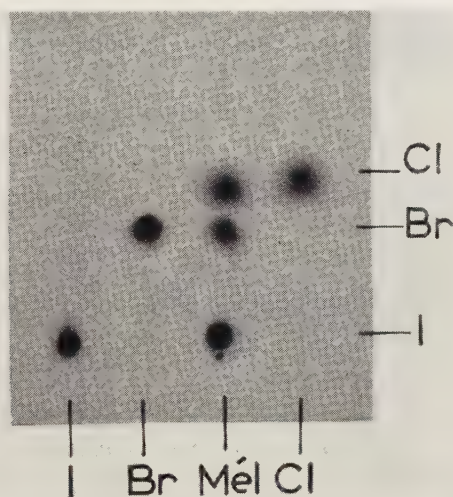


FIGURE 24

b) *Alcalino-terreux*. Un film chromatographique de résine échangeuse de cations Dowex 50 W.X.2 (H^+) nous a permis d'obtenir également une excellente séparation des cations alcalino-terreux, objectivée sur l'autoradiographie de la figure 25. Une solution aqueuse de lactate d'ammonium 0,75 M. aboutit à la différenciation par ordre de mobilités croissantes de ^{131}Ba , ^{89}Sr , ^{45}Ca .

D'autres essais de séparation de composés chimiques variés sont actuellement en cours et nous pensons également pouvoir utiliser, comme en couches minces classiques, d'autres types de résines échangeuses d'ions. Néanmoins, ces premiers résultats, publiés par

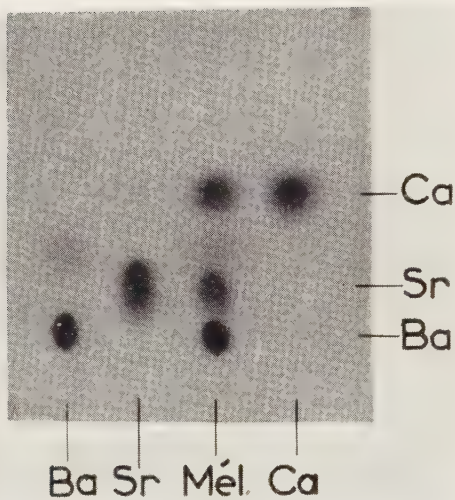


FIGURE 25

ailleurs (13), soulignent à nouveau les immenses possibilités de films chromatographiques, qui, en libérant l'utilisateur de nombreuses servitudes techniques, devraient mettre, dans un avenir très proche, la chromatographie sur couches minces à la portée de la plupart des laboratoires d'analyses.

CONCLUSIONS

LA première partie de notre travail est consacrée à une synthèse bibliographique des principaux travaux réalisés à l'aide de la chromatographie sur couches minces au cours de ces dernières années et nous nous sommes attachée principalement à classer, sous forme de tableaux synoptiques, les résultats les plus récents, obtenus depuis la parution des ouvrages de base de Stahl et de Randerath.

La partie expérimentale se subdivise en trois chapitres, qui reflètent d'ailleurs l'évolution chronologique de nos recherches.

LE CHAPITRE I est consacré aux *Couches minces de résines échangeuses d'ions*, dont la préparation comporte notamment l'incorporation à la résine pulvérulente d'une certaine proportion de poudre de cellulose, qui assure la stabilité et la conservation de la couche. Différents types de résine analytique à grains fins ont été utilisés, les uns échangeurs d'anions à groupements aminés ou ammonium quaternaire, les autres échangeurs de cations à groupements sulfonate ou amino-diacétate (complexants). Divers mélanges d'ions minéraux ou de molécules organiques polaires ou ionisées ont été ainsi résolus à l'aide de cette technique et, pour faciliter le repérage des fractions séparées, nous avons fait appel le plus souvent à la méthode des dilutions isotopiques, qui consiste à incorporer au mélange à analyser les ions radioactifs correspondant à chacun des constituants ou des molécules organiques identiques préalablement marquées. Les résultats obtenus peuvent se résumer et se classer de la manière suivante :

1. *Couches minces de résine échangeuse d'anions* :

- Séparation des halogénures Cl^- , Br^- et I^- sur Dowex 1.
- Séparation de la T.C.F. et de ses dérivés bromés ou iodés sur Dowex 1.

- Séparation des dérivés oxygénés minéraux de phosphore : hypophosphite, ortho-, pyro- et tripolyphosphates sur Bio-Rex 5.
- Séparation des nucléotides dérivés de l'Adénosine : AMP, ADP, ATP, Bio-Rex 5.

2. Couches minces de résine échangeuse de cations :

- Séparation partielle des alcalins Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ sur Dowex 50 ou Chelex 100.
- Séparation des alcalino-terreux Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} sur Dowex 50 ou Chelex 100.
- Séparation des métaux lourds du groupe H_2S : sur Chelex 100.
 - 1^{er} groupe : Pb^{++} , Ag^+ , Hg^+ .
 - 2^e groupe : Sb^{+++} , Bi^{+++} , Pb^{++} , Cu^{++} , Cd^{++} , Hg^{++} .
- Séparation des métaux du groupe du Sulfure d'ammonium : sur Chelex 100.
 - 3^e groupe : Al^{+++} , Fe^{+++} , Cr^{+++} .
 - 4^e groupe : Zn^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} .

Ces premiers résultats montrent que, par sa rapidité d'exécution et son caractère général, cette méthode, une fois parfaitement codifiée, doit rendre de multiples services en analyse minérale et même organique.

LE CHAPITRE II relate les premiers essais d'une technique originale, utilisant des *Couches minces successives, de nature différente et juxtaposées sur la même plaque de verre*. La préparation de ces couches polymorphes implique l'utilisation d'un appareillage spécial, permettant de juxtaposer simultanément deux ou plusieurs couches minces de nature différente, au sein desquelles le mélange à analyser migrera successivement, abandonnant ainsi progressivement ses constituants aux divers matériaux traversés. Il s'agit donc d'une chromatographie continue, faisant appel au cours d'une même opération aux pouvoirs séparateurs spécifiques de différentes couches successives et susceptible de mettre en jeu tour à tour l'adsorption, l'échange d'ions, le partage ou même des réactions chimiques variées. L'une des couches minces peut avoir essentiellement un rôle « épurateur » vis-à-vis de certains éléments, dont l'analyse proprement dite n'est pas nécessaire, mais qui sont susceptibles, par

contre, d'entraver la séparation chromatographique d'autres constituants. L'utilisation de la totalité des couches juxtaposées à des fins véritablement « analytiques » présente également un intérêt majeur : dans ce cas, sur la première couche mince seront séparés les constituants d'un premier groupe chimique et sur les suivantes les constituants d'autres groupes, de propriétés différentes.

1. *Double couches « Résine anionique/Résine cationique ».*

- Séparation d'Halogénures alcalins : Cl^- , Br^- , I^- sur Dowex 1 puis Na^+ , K^+ , Cs^+ sur Dowex 50.
- Séparation d'Halogénures alcalino-terreux : Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} sur Chelex 100, puis les halogènes sur Dowex 1.

2. *Couche « réactive »/Résine cationique.*

- Séparation de Ni^{++} sur cellulose imprégnée de diméthylglyoxime, puis de CO^{++} et Fe^{+++} sur Dowex 50.

3. *Double couches « Résine anionique ou cationique, Gel de Silice ».*

- Séparation d'Halohydrates d'alcaloïdes : Cl^- , Br^- , I^- sur Dowex 1, puis Atropine, Cocaïne et Morphine sur Gel de Silice.
- Séparation de sels alcalino-terreux de diacides aliphatiques homologues Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} sur Dowex 50, puis les acides oxalique, succinique et adipique sur Gel de Silice.

4. *Double couches « AgCl/Résine anionique ».*

- Séparation d'Halogénures, de T.C.F. et de ses dérivés halogénés : X^- (Br^- ou I^-) sur AgCl, puis les colorants sur Dowex 1.
- Séparation d'Iodure et d'acides aminés iodés thyroïdiens : I^- sur AgCl, puis Thyroxine, DIT et MIT sur Dowex 1.

Les séparations, qui ont été rapportées, ont été réalisées sur des doubles couches, mais des essais de couches triples ou quadruples ont déjà été effectués avec succès et nous pensons également pouvoir adapter ces couches multiples à la Chromatographie bidimensionnelle.

LE CHAPITRE III est consacré à la présentation d'une nouvelle technique fondée sur l'utilisation de *Couches chromatographiques ultra-minces*, fixées, non plus sur des plaques de verre, mais sur un support souple en polyester, transparent, isolant, très résistant et

insensible à la plupart des solvants (Brevet Kodak). Les résultats originaux, présentés ici, ont été obtenus à l'aide de feuilles chromatographiques de ce type, recouvertes de résine échangeuse d'ions. Des mélanges d'Halogénures (Cl^- , Br^- , I^-) et des mélanges de cations alcalino-terreux (Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++}) ont été chromatographiés avec le même succès, que sur les couches minces classiques, mais en un temps beaucoup plus court. Ce nouveau procédé semble appelé à un développement rapide et devrait donner ainsi, dans un proche avenir, un essor considérable à la Chromatographie sur couches minces.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALBERTI G., CAGLIOTO V. et LEDERER M. — *J. Chromatog.*, 1962, 7, 242.
- (2) AURENGE J., DEGENGES M. et NORMOND J. — *Bull. Soc. Chim.*, 1963, 1732.
- (3) BAUMLER J., RIPPSTEIN S. — *Pharmac. Acta Helvetiae*, 1961, 36, 382.
- (4) BRAUN D., GEENEN H. — *J. Chromatog.*, 1962, 7, 56.
- (5) BEKERSKY I. — *Analytic. Chem.*, 1963, 35, 261.
- (6) BENNETT R.D., HEFTMANN E. — *J. Chromatog.*, 1962, 9, 348-352.
- (7) BENNETT R.D., HEFTMANN E. — *J. Chromatog.*, 1962, 9, 353-358.
- (8) BERGER J.A., MEYNIEL G. et PETIT J. — *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 255, 1116.
- (9) BERGER J.A., MEYNIEL G., BLANQUET P. et PETIT J. — *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 257, 1534.
- (10) BERGER J.A., MEYNIEL G., PETIT J. et BLANQUET P. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1963, 2662.
- (11) BERGER J.A., MEYNIEL G. et PETIT J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1964, 3176.
- (12) BERGER J.A., MEYNIEL G. et PETIT J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1964, 3179.
- (13) BERGER J.A., MEYNIEL G. et PETIT J. — *C. R. Acad. Sci.*, 1964, 259, 2231.
- (14) BLANQUET P., MEYNIEL G., MOUNIER J. et ESTIBOTTE M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1958, 40, 369.
- (15) BOLLIGER H.R. — *Springer-Verlag*, Berlin, 1962, p. 221.
- (16) BRENNER M., NIEDERWIESER A., PATAKI G. — *Experientia* 1961 (Basle), 17, 145.
- (17) BRENNER M. et NIEDERWIESER. — *Experientia*, 1961, 17, 237.
- (18) BRODASKY T.F. — *Anal. Chem.*, mars 1963, vol. 35, n° 3, 343.
- (19) COHN W.E. et KOHN H.W. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1948, 70, 1986.
- (20) COHN W.E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 1471.
- (21) COHN W.E., in CHARGAFF E. and DAVIDSON J.N. (editors). — *The Nucleic Acids Academic Press*, New York, 1955, 1, 211.
- (22) CONSDEN R., GORDON A.H. et MARTIN A.I.P. — *Biochem*, 1944, 38, 224.

- (23) CROWE M. O'L. — *Anal. Chem.*, 1941, 13, 845.
- (24) DAUVILLIER P. — *J. Chromat.*, 1963, 11, 405.
- (25) DAVID S., HIRSHFELD H. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1963, n° 5, mai, 1011-1013.
- (26) DAVIES B.H. — *J. Chromatog.*, 1963, 10, 518.
- (27) DEFERRARI J.O., MUCHNICK R., MATSUHIRO B., SPROVIERO J.F. — *J. Chromatog.*, 1962, 9, 283-290.
- (28) De GEISO R.C., RIEMAN W. et LINDENBAUM S. — *Anal. Chem.*, 1954, 26, 1840.
- (29) DEMOLE E. — *J. of Chromatography*, 1958, 1, 24.
- (30) DEMOLE E. — *J. of Chromatography*, 1961, 6, 2.
- (31) DICARLO F.J., HARTIGNAN J.M., PHILLIPS G.E. — *Anal. Chem.*, 1964, vol. 36, n° 12, 2301.
- (32) DUMAZERT C., GHIGLIONE C. et Mme PUGNET T. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1963, n° 3, 21, 227-232.
- (33) DUNCAN G.R. — *J. Chromat.*, 1962, 8, 37.
- (34) EGGER K. — *Z. Anal. Chem.*, 1961, 182, 161.
- (35) EGGER K. — *Planta*, 1962, 58, 664.
- (36) FAHMY A.R., NIEDERWIESER A., PATAKI G., BRENNER M. — *Helv. Chim. Acta*, 1961, 44, 2022.
- (37) FISCHER R., LAUTNER H. — *Arch. Pharm.*, 1961, 294/66, 1.
- (38) FLETCHER K. — *Biochem J.*, 1957, 67, 136.
- (39) GAILLARD G. — *Thèse Doctorat en Pharmacie* (Etat), 1963, Clermont-Ferrand.
- (40) GAMP A., SUDER P., LINDE H. et MEYER K. — *Experientia*, 1962, 18, 292.
- (41) GANSHIRT H., MALZACHER A. — *Naturwiss.*, 1960, 47, 279.
- (42) GANSHIRT H. — Dans (129)-317.
- (43) GANSHIRT H., KOSS F.W., MORIANZ K. — *Arzneimittel-Forsch*, 1960, 10, 943.
- (44) GANSHIRT H., MALZACHER A. — *Arch. Pharma*, 1960, 293/65, 925.
- (45) GANSHIRT H. — *Springer-Verlag*, Berlin, 1962, 340.
- (46) GAREL J.P. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1964, 653.
- (47) HABERMANN E., BANDTLOW G. et KRUSCHE. — *Klin. Wschr.*, 1961, 39, 816.
- (48) HAKUMAT-RAI, FRED-LEE G. — *Anal. Chem.*, 1964, vol. 36, n° 11, 2208.
- (49) HALMEKOSKI J. — *Suomen Kemistilenti*, 1962, 35, 39.
- (50) HERMANECK S., SCHWARZ V., CEKAN Z. — *Pharmazie*, 1961, 16, 566.
- (51) HESSE G., cité par SCHORN P.J. — *Glas und Instrumenten Technik*, 1961, 5, 43.

- (52) HIRS C.H.W. — *J. Biol. Chemistry*, 1956, 219, 611.
- (53) HOFMAN A.F. — *Analytic. Biochem.*, (New York), 1962, 3, 145.
- (54) HONNEGER C.G. — *Helv. Chim., Acta*, 1961, 44, 173.
- (55) IKRAM M., KHUDA-BAKHS M. — *Anal. Chem.*, 1964, vol. 36, n° 1, 111.
- (56) ISLER O., RUEG R. et SCHUDEL P. — *Chimia (Zurich)*, 1961, 15, 208.
- (57) ISMAILOV N.A. et SCHRAIBER M.S. — *Farmazia*, 1938, 3, 1.
- (58) JACQUES W. et MATHIEU J.P. — *Bull. Soc. Chim.*, 1946, p. 94.
- (59) JAYME G. et HAHN G. — *Angew. Chem.*, 1960, 72, 520.
- (60) KAUFMANN H.P., MAKUS Z. — *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1960, 62, 1014.
- (61) KAUFMANN H.P. et MAKUS Z. — *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, 62, 1014.
- (62) KAUFMANN H.P., MAKUS Z. et DEICKE F. — *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, 63, 235.
- (64) KAUFMANN H.P., SUKO Y. — *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, 63, 828.
- (64) KAUFMANN H.P., KHOE T.H. — *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1962, 64, 81.
- (65) KAYAS G. — *J. Chim. phys.*, 1950, 47, 408.
- (66) KIRCHNER I.G. et KELLER G.I. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 1867.
- (67) KIRCHNER I.G., MILLER J.M. et KELLER G.I. — *Anal. Chem. Soc.*, 1951, 23, 420.
- (68) LAGONI H. et WERTMANN A. — *Milchwissenschaften*, 1955, 10, 360.
- (69) LEES T.M. et DE MURIA P.J. — *Chromat.*, 1962, 8, 108.
- (69 bis) LESTIENNE A., PRZYBYLOWICZ E.P., STAUDENMEYER W.J., PERRY E.S., BAITSHOLTS A.D. et TISCHER T.N. — *III^e Symposium de Chromatographie*, Bruxelles, 14-15 septembre 1964 (à paraître).
- (70) LERNER H. et RIEMAN W. — *Anal. Chem.*, 1954, 26, 610.
- (71) LICHTENBERGER W. — *Z. Anal. Chem.*, 1962, 185, 111.
- (72) LIEBICH H. — *Dtsch. Apotheker-Ztg.*, 1959, 99, 1246.
- (73) MANGOLD H.K., KAMMERRECH R., MALINS D.C. — *Microchem J., symposium*, vol. II.
- (74) MANGOLD H.K., MALINS D.C. — *J. Am. Oil. Chemists' Soc.*, 1960, 37, 383.
- (75) MANGOLD H.K. et KAMMERRECH R. — *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 1962, 39, 201.
- (76) MARCUCCI P. et MUSSINI F. — *J. Chromat.*, 1963, 11, 270.
- (77) MARINI BETTOLO G.B. — *Symposium on thin-layer chromatography*, Elsevier, 1964.
- (78) MEINHARD J.E. et HALL N.F. — *Anal. Chem.*, 1949, 21, 185.

- (79) METCHE M., HALUK J.P., QUAT-HAO N. et URION E. — *Bull. Soc. Chim.*, 1963, p. 1080.
- (80) MEYNIER G., BLANQUET P., MOUNIER J. et TOBIAS C.A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 419.
- (81) MILDRED GEE. — *J. Chromatog.*, 1962, 9, 278-282.
- (82) MILDRED GEE. — *Anal. Chem.*, 1963, 35, 350.
- (83) MOTTIER M. et POTTERAT M. — *Mitt. Geb. Lebensm. U. Hyg.*, 1952, 43, 118.
- (84) MOUTON M., Mmes JAQUARD S. et SAGOT-MASSON M. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1963, n° 3, 21, 233-238.
- (85) NEHER Dr R., et VON ARX E. (Bâle). — *Communication personnelle dans Randerath K Thin layer chromatography*, Academic Press, New York, London, 1963, p. 15.
- (86) PARIS R.R., PARIS M. — *Bull. Soc. Chim.*, 1963, 1597.
- (87) PASTUSKA G. — *Z Analyt. Chem.*, 1961, 179, 427.
- (88) PASTUSKA G., et TRINKS H. — *Chemiker Ztg*, 1961, 85, 535 et 1962, 86, 135.
- (89) PEIFER J.J. — *Mikrochim. Acta.*, 1962, p. 529.
- (90) PETROWITZ Dr H.J., Berlin. — *Communication personnelle*.
- (91) PLANTA C., SCHWIETER U., CHOPARD L., RUEGG R., KOFLER M., ISLER O. — *Helv. Chim. Acta.*, 1962, 45, 548.
- (92) PREY V., BERBALK H. et KAUSZ M. — *Mickrochim Acta.*, H-6, 1961, 968.
- (93) PREY V., BERBALK H., KAUSZ M. — *Mickrochim Acta.*, 1962, 449.
- (94) RAMSEY H.A. — *Anal. Biochem.*, 1963, 5, 83.
- (95) RANDERATH R. et STRUCK H.J. — *Chromat.*, 1961, 6, 365.
- (96) RANDERATH K. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961-1962, 6, 452.
- (97) RANDERATH K. — *Angew Chem.*, 1962, 74, 484, Internat, Edition 1962, 1, 435.
- (98) RANDERATH K. — *Dünnschicht chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
 RANDERATH K. — *Thin-layer chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim et Academic Press, New York et London, 1963.
 RANDERATH K. — *Chromatographie en couches minces*, Gauthier-Villars, Paris, 1964.
- (99) REITSEMA R.H. — *Anal. Chem.*, 1954, 26, 960.
- (100) RINK M., et HERMANN. — *Communication privée*. Dans (129), p. 480.
- (101) ROUCAYROL J., PAVLICEK et DEYL Z. — *Proc. Symp. Thin-Layer chromatog.*, Rome, mai 1963. Sous presse.
- (102) ROUCAYROL J.C. et TAILLANDIER P. — *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 256, 4653.

- (103) ROUCAYROL J.C., BERGER J.A. et MEYNIEL G. — *Inter. J. Of applied rad. isotop.* (A paraître).
- (104) RUEGG R., ISLER O. — *Planta Med.*, 1962, 9, 386.
- (105) RUSIECKI W., HENNENBERG M. — *Anne. Pharm. Fr.*, 1963, 21, n° 12, 843-846.
- (106) SAENZ LASCANO RUIZ I. Mme, LAROCHE Mlle C. — *Bul. Soc. Chim.*, 1963, 1594.
- (107) SAWICKI E., STANLEY T.W., ELBERT W.C., PFAFF J.D. — *Anal. Chem.*, 1964, vol. 36, n° 3, mars, p. 497.
- (108) SCHMIDT V., ELMENDORFF H. — *Z. Ges. exp. Med.*, 1958, 130, 142-145.
- (109) SCHWEIGER A. — *J. Chromatog.*, 1962, 9, 374-376.
- (110) SEHER A. — *Microchim. Acta.*, 1961, 308.
- (111) SEILER H. et M. — *Helv. Chem. Acta.*, 1960, 43, 1939.
- (112) SEILER H., ROTHWEILER W. — *Helv. Chem. Acta.*, 1961, 44, 941.
- (113) SEILER H., KAFFENBERGER T. — *Helv. Chem. Acta.*, 1961, 44, 1282.
- (114) SEILER H. — *Helv. Chem. Acta.*, 1961, 44, 1753.
- (115) SEILER H. — Dans (129), p. 491.
- (116) SILIPRANDI D. et N. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1954, 14, 52.
- (117) SMITH L., FOELL T. — *J. Chromatographie*, 1962, 9, 339-344.
- (118) Special thin Layer Chromatography résine. — *J. of Chromatog.*, 1962, vol. 9, n° 3.
- (119) STAHL E. — *Pharmazie*, 1956, 11, 633.
 STAHL E. — *Chemiker, Ztg.*, 1958, 82 323.
 STAHL E. — *Parfümerie et Kosmetik*, 1958, 39, 564.
 STAHL E. — *Pharmaz. Rdsch.*, 1959, 1, 1.
 STAHL E. — *Pharmaz. Rdsch.*, 1959, 2, 1.
 STAHL E. — *Arch. Pharmazie*, 1959, 292/64, 411.
 STAHL E. — *Arch. Pharmazie*, 1960, 293/65, 531.
 STAHL E. — *Chemiker, Ztg.*, 1961, 85, 371.
 STAHL E. — *Angew. Chem.*, 1961, 73, 646.
- (120) STAHL E. — *Chemiker, Ztg.*, 1958, 82, 323.
- (121) STAHL E. — *Parfümerie et Kosmetik*, 1958, 39, 564.
- (122) STAHL E. — *Arch. Pharmazie*, 1959, 292/64, 411.
- (123) STAHL E. — *Arch. Pharmazie*, 1960, 293, 531.
- (124) STAHL E., KALDEWEY H. — *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1961, 323, 182.
- (125) STAHL E., KALTENBACH U. — *J. Chromat.*, 1961, 5, 351.
- (126) STAHL E., KALTENBACH U. — *J. Chromatog.*, 1961, 5, 458.
- (127) STAHL E., PAECH K., TRACEY M.V. — *Moderne Methoden des planzenanalyse*, Springer-Verlag, 1962.
- (128) STAHL E. — *Dünnschicht-chromatographie*. Springer-Verlag, Berlin, 1962.

- (129) STAHL E. — *Thin-layer chromatography*, Springer-Verlag, Berlin et Academic Press, New York, 1963.
- (130) STANLEY W.L., VANNIER S.H. et GENTILI B. — *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 1957, 40, 282.
- (131) STRAIN H.H. — *Chromatographie Adsorption Analysis*, Interscience Publ. Inc., New York, 1942.
- (132) TEICHERT K., MUTSCHLER E., ROCHELMMEYER H. — *Dtsch. Apotheker. Ztg.*, 1960, 100, 223.
- (133) TEICHERT K., MUTSCHLER E., ROCHELMMEYER H. — *Dtsch. Apotheker. Ztg.*, 1960, 100, 477.
- (134) TOMPKINS E.R., KHYM J.X. et COHN W.E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1947, 69, 2769.
- (135) TRAPPE W. — *Biochem. Z.* (1940), 305, 150 ; 1940, 306, 316.
- (136) TUNA N., MANGOLD H.K., MOSSER D. — *Lancet* (en impression).
- (137) TURINA S., MARJANOVIC KRAJOVAN V., et OBRADOVIC V. — *Anal. Chem.*, (1964), 36, 1905.
- (138) U.S. Dép. of Commerce, N.B.S., 1951, circular 514. Cité par STAHL E., *Chem. Ztg.*, 1961, 85, 371.
- (139) VARMA T.N.R., PANALAKS T., MURRAY T.K. — *Anal. Chemist.*, août 1964, vol. 36, n° 9, 1865.
- (140) WAGNER H., HORHAMMER L., WOLFF P. — *Biochem.* (1961), 334, 175.
- (141) WALDI D., SCHNACKERZ K., MUNTER F. — *J. Chromatog.*, (1961), 6, 61.
- (142) WALDI D. — Dans (129), p. 328.
- (143) WALDI D. — *Sprühreagentien für Dünnschicht. Chromatographie*, dans (129).
- (144) WALDI D., MUNTER F., WOLPERT E. — *Klin-Wschr.*, 1962, 40, 827.
- (145) WALDI D., MUNTER F., WOLPERT E. — *Arch. Pharm.*, 1962, 295/32, 125.
- (146) WASICKY R. — *Analytic. Chem.*, 1962, 34, 1346.
- (147) WIELAND T., LUBEN G. et H. DETERMANN. — *Experientia* (Bâle), 1962, 18, 430.
- (148) WILLIAMS T.I. — *Introduction to chromatography*. Glasgow, Blackie et Son., 1947.
- (149) WINTERSTEIN A., STUDER A. et RUEGG A. — *Chem. Ber.*, 1960, 93, 2951.
- (150) WOLLENWEBER P. — *J. Chromatogr.*, 1962, 9, 369-371.
- (151) WOLLENWEBER P. — *J. Chromatogr.*, 1962, 7, 557.
- (152) ZECHMEISTER L., et CHOLNOKY L. Von. — *Die chromatographische Adsorptionanalyse*. 2. Aufl. Wien, Springer Verlag, 1938.

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la faculté

LA COMPLEXOMÉTRIE : APPLICATIONS A L'ANALYSE MINÉRALE,
ORGANIQUE ET PHARMACEUTIQUE

VU :

Le 23 novembre 1965.

Le président de thèse :

J. DAUPHIN.

VU :

Le 24 novembre 1965.

Le Doyen :

G. MEYNIEL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

N° 53/65

Clermont-Ferrand, le 25 novembre 1965.

*Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université :*

E. LAPALUS.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
<i>Avant-propos</i>	5
INTRODUCTION	7

PREMIÈRE PARTIE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<i>Chapitre premier. — MODALITÉS TECHNIQUES CLASSIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES</i>	13
I. — <i>Confection des couches minces</i>	13
1°) Préparation des plaques	14
2°) Nature des couches minces	16
II. — <i>Développement chromatographique. Appareillage</i> ..	19
1°) Chromatographie ascendante	19
a) Opérations préliminaires	19
b) Dépôts des substances	19
c) Cuves de développement	20
d) Solvants	21
2°) Autres modes de développement	23
a) Chromatographie descendante	23
b) Chromatographie horizontale	23
c) Chromatographie centrifuge	24
d) Electrophorèse sur couches minces	24
3°) Modalités techniques diverses	24
a) Développements répétés. Technique par étape ..	24
b) Technique des bandes en cônes	25
c) Chromatographie bidimensionnelle	25
d) Technique des gradients	25
e) Technique S.R.S. (« séparation-réaction-séparation »)	25

III. — <i>Détection et dosage des substances séparées sur couches minces</i>	26
--	----

Chapitre II. — APPLICATIONS ANALYTIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES CLASSIQUES	29
---	----

Tableau 2) IONS MINÉRAUX	31
» 3) SUCRES ET DÉRIVÉS	33
» 4) LIPIDES	34
» 5) AMINO-ACIDES	36
» 6) ACIDES NUCLÉIQUES. NUCLÉOTIDES	37
» 7) ALCALOÏDES	38
» 8) VITAMINES	40
» 9) STÉROIDES	42
» 10) MÉDICAMENTS	45
» 11) DIVERS	47

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Chapitre premier. — COUCHES MINCES DE RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS	53
--	----

I. — <i>Préparation des couches minces de résines échangeuses d'ions</i>	54
--	----

II. — <i>Séparations réalisées sur couches minces de résines échangeuses d'anions</i>	57
1°) Halogènes	57
2°) Molécules organiques halogénées	59
3°) Phosphates	61
4°) Nucléotides	63

III. — <i>Séparations réalisées sur couches minces de résines échangeuses de cations</i>	64
1°) Alcalins	64
2°) Alcalino-terreux	67
3°) Métaux lourds	70
a) Groupes de l'hydrogène sulfuré	71
Premier groupe : Pb, Ag, Hg ⁺	71
Deuxième groupe : Sb, Bi, Pb, Cu, Cd, Hg ⁺⁺	72
b) Groupes du sulfure d'ammonium	73
Troisième groupe : Al, Fe, Cr	73
Quatrième groupe : Zn, Mn, Ni, Co	73

<i>Chapitre II. — COUCHES MINCES SUCCESSIVES DE NATURE DIFFÉRENTE ET JUXTAPOSÉES SUR LA MÊME PLAQUE DE VERRE.</i>	77
I. — <i>Préparation des couches multiples juxtaposées</i>	78
II. — <i>Séparations réalisées sur doubles couches « Résine anionique - Résine cationique »</i>	80
1°) Mélange d'halogénures alcalins	80
2°) Mélange d'halogénures alcalino-terreux	81
III. — <i>Séparations réalisées sur « couches réactives - Résine cationique »</i>	83
IV. — <i>Séparations réalisées sur doubles couches « Résine échangeuse - gel de silice »</i>	84
1°) Résine anionique - gel de silice (halohydrates d'alcaloïdes)	85
2°) Résine cationique - gel de silice (sels alcalino-terreux de diacides aliphatiques homologues)	86
V. — <i>Séparations réalisées sur doubles couches « AgCl - Résine anionique »</i>	89
1°) Mélange d'halogénures, de T.C.F. et de ses dérivés halogénés	90
2°) Mélange d'iodures et d'acides aminés thyroïdiens	90
<i>Chapitre III. — FEUILLES CHROMATOGRAPHIQUES KODAK</i>	93
I. — <i>Généralités</i>	93
1°) Principales caractéristiques	93
2°) Divers types de feuilles chromatographiques	94
3°) Modes d'utilisation	95
II. — <i>Applications</i>	96
1°) Premiers résultats analytiques	96
2°) Feuilles chromatographiques à base de résines échangeuses d'ions	96
<i>Tableau</i> 13	97
» 14	99
a) Halogènes	101
b) Alcalino-terreux	101
CONCLUSIONS	103
BIBLIOGRAPHIE	107

G. DE BUSSAC
CLERMONT-FERRAND
2, COURS SABLON

